

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Medicina



TESIS DOCTORAL

Estudio del efecto de enoxaparina sobre la cirrosis e hipertensión
portal experimental

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

José Ignacio Fortea Ormaechea

Director

Rafael Bañares Cañizares
Javier Vaquero Martín
Cristina Ripoll Noiseux

Madrid, 2017

© José Ignacio Fortea Ormaechea, 2016

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE MEDICINA



TESIS DOCTORAL

***ESTUDIO DEL EFECTO DE LA ENOXAPARINA SOBRE LA
CIRROSIS E HIPERTENSIÓN PORTAL EXPERIMENTAL***

Directores: Dr. Rafael Bañares Cañizares

Dr. Javier Vaquero Martín

Dra. Cristina Ripoll Noiseux

Doctorando: José Ignacio Fortea Ormaechea

Madrid 2015



Universidad Complutense

Facultad de Medicina

Departamento de Medicina

Don Rafael Bañares Cañizares, Don Javier Vaquero Martín y Doña Cristina Ripoll Noiseux,

CERTIFICAN:

Que el trabajo de investigación titulado **“ESTUDIO DEL EFECTO DE LA ENOXAPARINA SOBRE LA CIRROSIS E HIPERTENSIÓN PORTAL EXPERIMENTAL”**, presentado por **JOSÉ IGNACIO FORTEA ORMAECHEA**, se ha realizado bajo nuestra dirección y supervisión y consideramos que reúne todos y cada uno de los requisitos necesarios para ser presentado como Tesis Doctoral, y defendida ante el Tribunal correspondiente para optar al grado de Doctor en Medicina.

Y para que conste, se firman el presente certificado en Madrid a uno de Octubre del 2015.

R. Bañares Cañizares

J. Vaquero Martín

C. Ripoll Noiseux

A Itxasne y Miguel, mis sustentos

ÍNDICE

1.	AGRADECIMIENTOS	1
2.	GLOSARIO DE ABREVIATURAS	5
3.	INDICE DE FIGURAS	11
4.	INDICE DE TABLAS	15
5.	RESUMEN/ABSTRACT	19
5.1.	RESUMEN	21
5.2.	ABSTRACT	29
6.	INTRODUCCIÓN	35
6.1.	Hemostasia y anticoagulación en la cirrosis hepática.	37
6.2.	Las alteraciones de la hemostasia influyen en la progresión de la enfermedad hepática.	39
6.3.	La anticoagulación como posible tratamiento antifibrogénico en la cirrosis hepática.	40
6.4.	Modelos animales de cirrosis hepática e hipertensión portal	44
6.4.1.	Ligadura parcial de la porta (LPVP)	47
6.4.2.	Ligadura del colédoco (LC)	48
6.4.3.	Cirrosis inducida por la administración de CCl ₄ .	50
6.5.	Métodos de anestesia en estudios experimentales	58
7.	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	66
7.1.	Hipótesis	68
7.2.	Objetivos	69
8.	MÉTODOS	72
8.1.	Animales y diseños experimentales	74
8.2.	Protocolos de inducción de cirrosis hepática por administración de CCl ₄ .	80
8.3.	Protocolos quirúrgicos de hipertensión portal pre-hepática y cirrosis biliar.	82
8.4.	Anestesia.	83
8.5.	Estudio hemodinámico	84
8.6.	Perfusión hepática portal aislada y bi-vascular ex-vivo.	84

8.7. Medición de parámetros hematológicos, bioquímicos y gasométricos.	87
8.8. Técnicas histológicas y cuantificación de la fibrosis hepática.....	87
8.9. Cultivo de líquido ascítico.....	88
8.10. Medición de niveles circulantes de IL-6.	88
8.11. Análisis de expresión de genes pro-fibrogénicos en tejido hepático.	88
8.12. Análisis estadístico.	89
9. RESULTADOS	90
9.1. <u>OBJETIVO I</u> : OPTIMIZACIÓN DE ASPECTOS DEL DISEÑO EXPERIMENTAL CRUCIALES PARA LA EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS DE LA ENOXAPARINA SOBRE LA CIRROSIS HEPÁTICA EN RATAS.	92
9.1.1. Objetivo I.A: Comparación de dos protocolos de inducción de cirrosis hepática en ratas basados en la administración oral de CCl ₄	92
9.1.2. Objetivo I.B: Comparación de los efectos de la anestesia con sevoflurano con los de la anestesia con Ketamina+Diazepam en ratas normales y en ratas con hipertensión portal inducida por la ligadura parcial de la vena porta.....	102
9.2. <u>OBJETIVO II</u> : Determinar los efectos de la enoxaparina, incluyendo la evaluación de distintas dosis, sobre la fibrosis hepática, la hipertensión portal y la disfunción endotelial, utilizando 3 modelos experimentales de cirrosis hepática.	111
9.2.1. Objetivo II.A: Evaluación de los efectos de la enoxaparina en ratas con cirrosis hepática inducida por la administración oral de CCl ₄ y en ratas con cirrosis hepática inducida por la ligadura del colédoco.	111
9.2.2. Objetivo II.B: Evaluación de los efectos de la enoxaparina sobre la disfunción endotelial evaluada en estudios de perfusión hepática bivascular ex- vivo en ratas con cirrosis hepática inducida por inhalación de CCl ₄	126
10. DISCUSIÓN	132
11. RESUMEN	152
12. CONCLUSIONES	158
13. BIBLIOGRAFÍA	162

1. AGRADECIMIENTOS

Varios años han pasado desde que comencé mi andadura por la investigación básica. No recuerdo la fecha exacta, pero sí mis dudas por iniciar un camino absolutamente desconocido para mí. Ahora que alcanzo a ver el final de esta primera etapa miro atrás y observo con orgullo y con una gran sonrisa la sinuosa, y a veces espinada, senda que me ha llevado hasta aquí. Recuerdo de forma nítida mi desesperación por las canalizaciones fallidas de la “bendita y a veces maldita” vena ileocólica, de la “trabajada” administración del tetracloruro de carbono, y de las largas y agotadoras jornadas en el laboratorio. Y pese a todo, insisto, lo recuerdo con cariño y nostalgia. Ello se debe fundamentalmente a las extraordinarias personas que me han enseñado, guiado, apoyado y animado durante todo este tiempo. Sin ellos, esta tesis nunca hubiese visto la luz. Las próximas líneas solo expresan parcialmente el reconocimiento y cariño que les profeso.

Mis agradecimientos deben comenzar con mis directores de tesis. El **Dr. Rafael Bañares (Rafa)** fue nada más y nada menos la persona en la que deposité mi confianza para iniciar mi carrera investigadora, además de ser uno de mis grandes referentes profesionales. Siempre le estaré agradecido por su apoyo, guía y cariño en todos estos años. La **Dra. Cristina Ripoll (Cris)** es otro de mis referentes, y me atrevería a decir que el ejemplo a seguir por todos los residentes con inquietudes investigadoras. El respeto con el que escuchaba (escucha) nuestras opiniones y el perpetuo cuestionamiento científico de nuestras decisiones médicas son dos de sus características más extraordinarias que siempre intento aplicar en mi día a día. No puedo dejar de mencionar que el principal proyecto de investigación que compone la presente tesis ha sido financiado gracias a la beca FIS que le fue concedida hace 4 años. Pero si hay un coprotagonista en esta tesis, es sin duda el **Dr. Javier Vaquero (Javi)**. Gracias a él el barco ha llegado a puerto. Siempre le agradeceré su enorme interés en mi formación investigadora, su trato respetuoso y afectuoso, y su confianza en mí y en el proyecto. Pero es su amor por la ciencia y por el trabajo bien hecho, y muy especialmente su gran humanidad, lo que le convierte en uno de mis referentes en el ámbito tanto personal como profesional.

Los agradecimientos deben continuar con mis compañeros de laboratorio. Mención especial merece **Carolina Fernández Mena (Carol o “compi”)** por las

diferentes tareas que realizó siempre con una sonrisa y por muy prolongada que fuese la jornada. Otra mención especial merecen **Jorge Almagro** y **Juan Bañares** por su increíble trabajo realizado en la Universidad de Montreal, y **Alexander Zipprich** por sus complicados experimentos de perfusión desarrollados en la Universidad de Martín Lutero de Halle. Otros miembros destacados del presente proyecto son **Cristina Bosoi** y **Christopher Rose** de la Universidad de Montreal y **Marta Puerto**, con quien los ELISA pierden su misterio. **Juan Antonio Rodríguez-Feo (Juanan)**, **nuestros compañeros de Nefrología**, y buena parte de los **trabajadores del animalario** merecen también mi más sincero agradecimiento por su apoyo y cariño. Es mi esperanza que en el futuro pueda seguir colaborando con todos ellos desde mi Cantabria querida.

Toca dar paso a familia y amigos. A **mis padres y hermano Juan** agradecerles profundamente su apoyo y cariño en esta, y todas las fases de mi vida. Muchos menos han sido los traspies, y también mucho menos dolorosos, gracias a su guía y perenne presencia. A mi sobrino **Mateo** por la alegría que nos trasmite, y a la **familia Cabezón Estévez** por aceptar como un nuevo miembro de la familia a todo un merengue (¡y en pleno centro de Bilbao!). A mis amigos de Madrid (muy especialmente a mis coeres **Ainhoa** y **Leti**, y mis residentes mayores **Alaín**, **María** y **Anita**) y Santander (los **Mosqueteros** y **Cántabros por el mundo**) darles las gracias por recargarme las pilas cuando estaban vacías y hacerme desconectar cuando correspondía.

Y ahora le toca a mi **Itxasne** y mi hijo **Miguel**. Sonrío con emoción al recordar la paciencia, e incluso interés, con la que mi querida Itxas escuchaba mis largos y frecuentes monólogos sobre mis progresos o retrocesos en el laboratorio. Ha sido gracias a ella que he podido disfrutar plenamente de esta aventura investigadora y llegar “entero” y feliz a este momento. Un momento crucial e irrepetible por la reciente llegada de nuestro querido hijo **Miguel**. Tan solo han pasado 5 meses desde su llegada, pero no me imagino un pasado, presente o futuro sin él. Por todo ello, la presente tesis va a dedicada a ellos, a mis sustentos.

2. GLOSARIO DE ABREVIATURAS

α -SMA: α -smooth muscle actin (alfa actina del músculo liso);

ALT: Alanina aminotransferasa

AMS: Arteria mesentérica superior

ARNm: ácido ribonucleico mensajero

AST: Aspartato aminotransferasa

CAM: Concentración mínima alveolar

CCl₄: Tetracloruro de carbono

DMN: Dimetilnitrosamina

FA: Fosfatasa alcalina

FC: Frecuencia cardiaca

FHA: Flujo hepático arterial

FHP: Flujo hepático portal

FR: Frecuencia respiratoria

FSHT: Flujo sanguíneo hepático total

GC: Gasto cardiaco

GGT: gamma-glutamyl transpeptidasa

H: Hembra

HBBA: Heparinas de baja actividad anticoagulante

HBPM: Heparina de bajo peso molecular

HCO₃: Bicarbonato

Hg: Mercurio

HGF: Hepatocyte growth factor (factor de crecimiento hepatocitario)

HNF: Heparina no fraccionada

HTP: Hipertensión portal

im: Intramuscular

INR: International Normalized Ratio (Relación Normalizada Internacional)

ip: Intraperitoneal

iv: Intravenoso

K: Potasio

LC: Ligadura del colédoco

LDH: Lactato deshidrogenasa

L-NMMA: NG-monometil-L-arginina

LPVP: Ligadura parcial de la vena porta

M: Macho

MMP-2: Metaloproteinasa de matriz 2

Na: Sodio

N.S.: No especificado

PAM: Presión arterial media

PBE: Peritonitis bacteriana espontánea

PC: Peso corporal

pCO₂: Presión parcial de dióxido de carbono

PDGF: Platelet derived growth factor (factor de crecimiento derivado de las plaquetas)

PHE: Fenobarbital

pO₂: Presión parcial de oxígeno.

PP: Presión portal

Ref: Referencia

RPT: Resistencia periférica total

SD: Desviación estándar

S-D: Cepa Sprague-Dawley

SNAP: S-Nitroso-N-Acetilpenicilamina

TGF- β 1: Transforming growth factor beta 1 (Factor de crecimiento transformante beta 1)

TIMP-1: inhibidor tisular de la metaloproteinasa 1

3. INDICE DE FIGURAS

Fig. 1. Hemostasia rebalanceada en la cirrosis hepática	39
Fig. 2. Posible papel de la coagulación en la progresión de la fibrosis hepática	41
Fig. 3. Mecanismos moleculares de hepatotoxicidad inducida por tetracloruro de carbono	51
Fig. 4. Diseños experimentales utilizados en los tres laboratorios	78
Fig. 5. Evolución de la ganancia de peso corporal	93
Fig. 6. Desarrollo de hipertensión portal, esplenomegalia y trombopenia	97
Fig. 7. Secciones hepáticas teñidas con rojo Sirio para evaluar la fibrosis	98
Fig. 8. Secciones hepáticas teñidas con tricrómico de Masson para evaluar la fibrosis	99
Fig. 9. Cuantificación del área de fibrosis hepática (%) con la tinción de rojo Sirio y con el tricrómico de Masson, y grado de atrofia hepática	100
Fig. 10. Desarrollo de atrofia hepática y esplenomegalia	102
Fig. 11. Frecuencia respiratoria y frecuencia cardíaca	104
Fig. 12. Niveles en sangre de bicarbonato, AST y lactato	107
Fig. 13. Presión portal	109
Fig. 14. Cuantificación del área de fibrosis hepática (%) con la tinción de rojo Sirio y con el tricrómico de Masson, y grado de atrofia hepática en el modelo de cirrosis inducida por la administración oral de tetracloruro de carbono	116
Fig. 15. Secciones hepáticas teñidas con rojo Sirio para evaluar la fibrosis en el modelo de cirrosis inducida por la administración oral de tetracloruro de carbono	117
Fig. 16. Cuantificación del área de fibrosis hepática (%) con la tinción de rojo Sirio y grado de atrofia hepática en ratas con cirrosis biliar inducida por la ligadura del colédoco	118

Fig. 17. Secciones hepáticas teñidas con rojo Sirio para evaluar la fibrosis en el modelo de cirrosis inducida por la ligadura del colédoco	119
Fig. 18. Expresión de RNAm de los genes <i>Col1α1</i> (colágeno tipo 1), <i>Acta 2</i> (alpha-smooth muscle actin) y <i>Timp-1</i> (tissue inhibitor of metalloproteinases-1) en tejido hepático	120
Fig. 19. Presión portal y ratio “peso del bazo/peso corporal” en ratas con cirrosis hepática inducida por la administración oral de tetracloruro de carbono	122
Fig. 20. Presión portal y ratio “peso del bazo/peso corporal” en ratas con cirrosis biliar inducida por la ligadura del colédoco	124
Fig. 21. Curvas de dosis-respuesta de la resistencia venosa portal y de la resistencia sinusoidal en respuesta a la administración de acetilcolina y SNAP en ratas con cirrosis tratadas con enoxaparina o salino a partir de la octava semana de administración de tetracloruro de carbono inhalado	126
Fig. 22. Curvas de dosis-respuesta de la resistencia venosa portal y de la resistencia sinusoidal en respuesta a la administración de acetilcolina y SNAP en ratas con cirrosis tratadas con enoxaparina o salino desde el inicio de la administración de tetracloruro de carbono inhalado	127
Fig. 23. Curvas de dosis-respuesta de la resistencia arterial hepática en respuesta a la administración de dosis crecientes de metoxamina en presencia o ausencia de L-NMMA	129

4. INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Principales estudios de terapias anticoagulantes en modelos experimentales de cirrosis hepática en roedores	42
Tabla 2. Factores generales a tener en cuenta en la elección de un modelo experimental	46
Tabla 3. Utilidad de los principales modelos animales disponibles para el estudio de los diferentes aspectos de la fisiopatología de la hipertensión portal	47
Tabla 4. Categorías de severidad de procedimientos experimentales	48
Tabla 5. Medidas de almacenamiento de tetracloruro de carbono y medidas de protección	52
Tabla 6. Protocolos de inducción de cirrosis hepática mediante la administración orogástrica de tetracloruro de carbono	55
Tabla 7. Fases de la anestesia y componentes de la anestesia general	58
Tabla 8. Influencia del régimen anestésico en la hemodinámica sistémica y en la distribución del flujo sanguíneo: Estudios en ratas sin hipertensión portal.....	61
Tabla 9. Influencia del régimen anestésico en la hemodinámica sistémica y en la distribución del flujo sanguíneo: Estudios en ratas con hipertensión portal	63
Tabla 10. Dosis de tetracloruro de carbono ajustadas a los cambios en el peso corporal en cada protocolo	80
Tabla 11. Parámetros hematológicos, bioquímicos y de función hepática	94
Tabla 12. Parámetros hemodinámicos sistémicos y frecuencia respiratoria	95
Tabla 13. Parámetros hematológicos, bioquímicos y gasométricos	106
Tabla 14. Parámetros cardio-respiratorios (Objetivo I.B).....	108
Tabla 15. Parámetros hematológicos y bioquímicos	113
Tabla 16. Parámetros cardio-respiratorios (Objetivo II.A)	121

5. RESUMEN/ABSTRACT

5.1. RESUMEN

ESTUDIO DEL EFECTO DE LA ENOXAPARINA SOBRE LA CIRROSIS E HIPERTENSIÓN PORTAL EXPERIMENTAL

INTRODUCCIÓN

La administración de anticoagulantes en pacientes con cirrosis hepática es controvertida debido a que esta enfermedad ha sido considerada durante mucho tiempo un estado hipocoagulante. Sin embargo, en las últimas dos décadas se ha puesto de manifiesto que la hemostasia mantiene un equilibrio precario en pacientes con cirrosis hepática, pudiendo presentar tanto un fenotipo hipocoagulante como uno protrombótico, y que la anticoagulación en pacientes con cirrosis hepática no se asocia a un mayor riesgo de episodios hemorrágicos ni a una mayor mortalidad cuando dichos episodios se producen. Por otro lado, se ha sugerido además que este potencial estado procoagulante está íntimamente implicado en la progresión de la enfermedad hepática. Así, un reciente ensayo clínico en pacientes con cirrosis hepática descompensada mostró que la administración de dosis profilácticas de enoxaparina, una heparina de bajo peso molecular, no solo prevenía el desarrollo de trombosis portal, sino que también retrasaba la aparición de complicaciones de la enfermedad y aumentaba la supervivencia. En la misma línea, varios estudios experimentales han observado una mejoría de la fibrosis hepática mediante la administración de diferentes anticoagulantes. Todas estas observaciones, por tanto, establecen una base racional para la utilización de terapias anticoagulantes en la cirrosis. Es importante destacar, sin embargo, que la administración de anticoagulantes en todos los estudios experimentales previos se inició antes de que se hubiese establecido una cirrosis, que los efectos sobre la presión portal no fueron evaluados, y que la mejoría de la fibrosis en la mayoría de ellos fue relativamente pequeña.

En base a las evidencias clínicas y experimentales disponibles en la actualidad, pensamos que era importante realizar un estudio de los efectos de la administración a largo plazo de la enoxaparina en distintos modelos experimentales, administrando el fármaco una vez estuviese establecida la cirrosis hepática y valorando conjuntamente

su efecto sobre la fibrosis hepática, las alteraciones hemodinámicas sistémicas y hepáticas, y la respuesta inflamatoria sistémica. Este diseño reflejaría mejor el escenario clínico más relevante sobre el que se necesita actuar, y permitiría valorar de forma más exhaustiva la capacidad de la enoxaparina para modificar la historia natural de la cirrosis hepática. En este contexto, la selección de modelos animales que sean reproducibles y de un régimen anestésico adecuado para la realización de mediciones hemodinámicas son factores cruciales para optimizar la detección de los posibles efectos de la enoxaparina.

OBJETIVOS

El OBJETIVO GENERAL del presente trabajo fue evaluar los efectos de la enoxaparina sobre aspectos centrales de la historia natural de la cirrosis hepática, como el desarrollo de fibrosis hepática, de hipertensión portal, y de sus complicaciones. Nuestro proyecto incluyó dos estudios preliminares, uno dirigido a elegir el protocolo de administración oral de tetracloruro de carbono (CCl₄) más reproducible para el desarrollo de cirrosis, y otro dirigido a elegir el régimen anestésico más óptimo para las mediciones hemodinámicas *in vivo*.

Nuestros OBJETIVOS ESPECÍFICOS fueron:

I. Optimización del diseño experimental:

Objetivo I.A: Comparar la reproducibilidad de dos protocolos de inducción de cirrosis hepática en ratas basados en la administración oral de CCl₄ en relación a : i. La mortalidad asociada; ii. La curva de ganancia de peso corporal; iii. Parámetros hematológicos, bioquímicos y de función hepática; iv. Parámetros cardio-respiratorios; v. El desarrollo de hipertensión portal y ascitis; vi. El desarrollo de fibrosis y cirrosis hepática.

Objetivo I.B: Comparar los efectos de la anestesia con sevoflurano con los de la anestesia con Ketamina+Diazepam en ratas normales y en ratas con hipertensión portal prehepática inducida por la ligadura parcial de la vena porta. Los parámetros evaluados fueron: i. Parámetros anatómicos generales; ii. Estabilidad de la anestesia y necesidad de ajuste de dosis; iii. Mortalidad durante la anestesia; iv. Parámetros

hematológicos, bioquímicos y gasométricos; v. Parámetros hemodinámicos sistémicos; vi. Medición de la presión portal.

II. Determinar los efectos de la enoxaparina, incluyendo distintas dosis y utilizando 3 modelos experimentales de cirrosis hepática, sobre los siguientes aspectos de esta enfermedad:

Objetivo II.A: En ratas con cirrosis hepática inducida por la administración oral de CCl₄ y por la ligadura del colédoco (LC), evaluar el efecto de la enoxaparina sobre: i. La mortalidad; ii. La ganancia de peso corporal; iii. Parámetros hematológicos y bioquímicos; iv. El desarrollo de fibrosis hepática; v. Parámetros cardio-respiratorios; vi. El desarrollo de hipertensión portal y ascitis; vii. La translocación bacteriana y la respuesta inflamatoria sistémica.

Objetivo II.B: En ratas con cirrosis hepática inducida por la administración de CCl₄ inhalado, determinar el efecto de la enoxaparina sobre la disfunción endotelial evaluada tanto a nivel del lecho portal como de la arteria hepática.

MÉTODOS

Objetivo IA: Tres grupos de ratas Sprague-Dawley (S-D) macho recibieron por sondaje gástrico las siguientes sustancias durante 12 semanas o hasta la aparición de ascitis severa: el grupo control recibió agua una vez por semana (**CTRL**, n=11), el grupo del protocolo de Runyon recibió CCl₄ una vez por semana (**CCl₄-[1xSem]**, n=12), y el grupo del protocolo de Regimbeau modificado recibió CCl₄ dos veces por semana (lunes y viernes) (**CCl₄-[2xSem]**, n=15). Las dosis de CCl₄ fueron ajustadas a los cambios en el peso corporal. En la segunda-tercera semana tras recibir la última dosis de CCl₄, se realizó un estudio hemodinámico con medición de la presión portal, presión arterial media (PAM), y presión venosa central, y se tomaron muestras sanguíneas y tisulares. La fibrosis hepática se evaluó con las tinciones de Masson y rojo Sirio.

Objetivo IB: Cuarenta y una ratas S-D macho se dividieron aleatoriamente en 4 grupos en función de la realización o no de una ligadura parcial de la porta (LPVP) y del régimen anestésico utilizado durante la realización de un estudio hemodinámico: grupo normal con sevoflurano (**CTRL-Sevo**, n=8), grupo normal con

Ketamina+Diazepam (**CTRL-KD**, n=11), grupo LPVP con sevoflurano (**LPVP-Sevo**, n=9), y grupo LPVP con Ketamina+Diazepam (**LPVP-KD**, n=13). Se realizó un estudio hemodinámico para la medición de presiones sanguíneas, y se tomaron muestras sanguíneas y tisulares. En los grupos LPVP, dicho estudio se realizó 4 días después de la realización de la cirugía.

Objetivo IIA y B: Se utilizaron tres protocolos distintos para inducir cirrosis hepática en ratas S-D macho: 1) Administración orogástrica de CCl₄ durante 12 semanas según el protocolo de Regimbeau modificado (desarrollado en el objetivo IA del presente proyecto); 2) Administración de CCl₄ inhalado dos veces por semana durante 12 semanas; 3) Ligadura del colédoco. A los distintos grupos de ratas (n= 8-15 por grupo), se les administró diariamente suero salino o diferentes protocolos de enoxaparina por vía subcutánea: 40 UI/Kg de peso corporal a partir de la octava semana de administración de CCl₄; 180 UI/Kg de peso corporal a partir de la primera u octava semana de administración de CCl₄; y 180 UI/Kg de peso corporal a partir de la segunda semana tras la ligadura del colédoco. Los grupos control a los que se les administró agua por vía orogástrica o se les realizó una laparotomía sin ligadura del colédoco (cirugía Sham), siguieron estos mismos protocolos. Se midió la presión portal en la vena ileocólica y la fibrosis hepática se evaluó mediante las tinciones de Masson y rojo Sirio, y de la expresión en el hígado de los genes *Col1a1* (colágeno tipo-1), *Acta2* (alpha-smooth muscle actin) y *Timp1* (tissue inhibitor of metalloproteinases-1). Se determinó la presencia de peritonitis bacteriana espontánea cultivando el líquido ascítico en medio fluido de tioglicolato, y la respuesta inflamatoria sistémica se evaluó midiendo los niveles circulantes de IL-6. Para valorar la disfunción endotelial se realizaron estudios de perfusión portal y bi-vascular hepática *ex-vivo* en ratas con cirrosis hepática inducida por CCl₄ inhalado.

RESULTADOS

Objetivo IA: Comparado con los grupos **CTRL** y **CCl₄-[1xSem]**, el grupo **CCl₄-[2xSem]** desarrolló más frecuentemente ascitis (0% vs. 10% vs. 80%, $p < 0,01$), y presentó una mayor presión portal (6,8±1,5 vs. 9,9±2,2 vs. 14,5±2,7 mmHg, $p < 0,001$), esplenomegalia (evaluada por la relación peso bazo/peso corporal: 0,16±0,02 vs. 0,26±0,11 vs. 0,34±0,09,

$p < 0,001$) y trombocitopenia (905 ± 93 vs. 865 ± 97 vs. $542 \pm 246 \times 10^3$ plaquetas/uL, $p < 0,001$). Las ratas del grupo **CCl4-[2xSem]** también presentaron un mayor grado de atrofia hepática (evaluada por la relación peso hígado/peso corporal, $p < 0,001$) y de disfunción hepática evaluada por las concentraciones sanguíneas de glucosa ($p < 0,01$), albúmina ($p < 0,0001$), fibrinógeno ($p < 0,001$), bilirrubina total ($p < 0,01$) y por el valor del INR ($p < 0,0001$). No existieron diferencias en la mortalidad entre los grupos **CCl4-[1xSem]** y **CCl4-[2xSem]** (17% vs. 33%, $p = 0,41$).

Objetivo IB: Los dos regímenes anestésicos lograron una profundidad anestésica adecuada en ratas con y sin hipertensión portal, y no influyeron sobre la medición de la presión portal y de la PAM. Sin embargo, las ratas anestesiadas con Ketamina+Diazepam mostraron una mayor variabilidad individual que resultó en una mayor necesidad de ajuste de la dosificación (50 vs. 17,6 %, $p = 0,05$) y en una mayor mortalidad (20,8 vs 0 %; $p = 0,065$). Las ratas anestesiadas con Ketamina+Diazepam presentaron también una mayor elevación de AST (**CTRL-Sevo**: 62 ± 24 UI/mL, **CTRL-KD**: 123 ± 33 UI/mL, **LPVP-Sevo**: 74 ± 32 UI/mL, y **LPVP-KD**: 119 ± 31 UI/mL; $p = 0,007$), probablemente debida a necrosis muscular secundaria a la inyección de grandes volúmenes de estos anestésicos (un 150-435 % superiores a los recomendados).

Objetivo IIA: En comparación con los grupos control, las ratas con cirrosis inducida por la administración orogástrica de CCl4 mostraron una tendencia a una menor supervivencia y ganancia de PC, las cuales fueron agravadas por la administración de enoxaparina a dosis de 180 UI/kg ($p < 0,01$). Las ratas que recibieron CCl4 tuvieron alterados diversos parámetros analíticos (elevación de INR, AST, ALT, bilirrubina y disminución de albúmina, proteínas totales, glucosa y plaquetas), con independencia de la administración o no de enoxaparina. En todos los protocolos experimentales evaluados, las ratas con cirrosis hepática que recibieron salino o enoxaparina mostraron aumentos similares del área de fibrosis y de la expresión hepática de genes relacionados con la fibrosis en comparación con sus respectivos controles ($p < 0,001$). Las ratas con cirrosis hepática inducida por la administración orogástrica de CCl4 o por la ligadura del colédoco tuvieron una mayor presión portal y una mayor esplenomegalia que sus respectivos controles ($p < 0,001$),

también de forma independiente de recibir o no tratamiento con enoxaparina. En los dos modelos experimentales, la proporción de ratas con ascitis que desarrollaron una peritonitis bacteriana espontánea fue similar en aquellas que recibieron suero salino y en aquellas que recibieron enoxaparina (**CCl4-Sal**: 2 de 7 vs. **CCl4-Enox40**: 4 de 8, NS; **LC-Sal**: 1 de 6 vs. **LC-Enox180**: 2 de 7, NS). Los niveles de IL-6 circulantes fueron similares en estos grupos, independientemente del tratamiento con enoxaparina.

Objetivo IIB: Sólo se detectaron posibles efectos de la enoxaparina sobre la reactividad vascular hepática en aquellas ratas que recibieron enoxaparina a dosis alta (180 UI/Kg) desde el inicio de la administración de CCl4. Estas ratas presentaron unos valores más elevados de resistencia venosa hepática tras la exposición a dosis crecientes de acetilcolina y de S-nitroso acetilpenicilamina (SNAP, ambos $p < 0,05$), y un incremento de la resistencia sinusoidal tras la adición de SNAP ($p < 0,05$).

CONCLUSIONES

1. El protocolo de Regimbeau modificado desarrollado en nuestro trabajo representa un método más acelerado, eficaz y altamente reproducible de inducción de cirrosis hepática, hipertensión portal y ascitis por administración de CCl4 en comparación con el protocolo clásico de Runyon, sin asociar una mayor mortalidad.
2. La anestesia inhalada con sevoflurano es preferible a la anestesia intramuscular con Ketamina+Diazepam para la realización de estudios hemodinámicos sistémicos y hepáticos en ratas con y sin hipertensión portal por: a) su mayor estabilidad, b) su menor mortalidad asociada, c) por evitar la necesidad de inyectar volúmenes superiores a los recomendados por vía intramuscular en pequeños animales, probable causa de necrosis muscular con aumento de la AST, y d) por su idéntica capacidad para realizar mediciones válidas y precisas de la presión portal.
3. La administración crónica de enoxaparina a dosis altas o bajas no mejora la fibrosis hepática, la hipertensión portal o la disfunción endotelial en diversos modelos experimentales de cirrosis hepática avanzada en rata, sugiriendo que el protocolo

de administración y, sobre todo, el estadio de la cirrosis hepática pueden ser factores determinantes para la obtención de efectos beneficiosos del uso de la enoxaparina.

5.2. ABSTRACT

EFFECTS OF ENOXAPARIN ON CIRRHOSIS AND PORTAL HYPERTENSION: AN EXPERIMENTAL STUDY

INTRODUCTION

The use of anticoagulants in patients with liver cirrhosis is controversial because this disease has long been considered a hypocoagulable state. In the last two decades, however, it has been noted that haemostasis in patients with liver cirrhosis is in a precarious equilibrium that can easily be tipped towards either a prohaemorrhagic or a prothrombotic phenotype, and that anticoagulation in cirrhotic patients does not seem to increase neither the frequency of bleeding episodes nor their mortality when such episodes occur. Furthermore, it has been suggested that this potential prothrombotic state is intimately involved in the progression of liver disease. Thus, a recent clinical trial showed that the administration of a prophylactic dose of enoxaparin, a low-molecular-weight heparin, to patients with decompensated cirrhosis led to a reduction in portal thrombosis and other complications of liver disease, and to increased survival. Similarly, several experimental studies in the last decade have demonstrated an improvement in liver fibrosis by the administration of diverse anticoagulants. All these observations settle a rational basis for anticoagulation therapy in patients with liver cirrhosis. In all the previous studies, however, it should be noted that the administration of anticoagulants started before liver cirrhosis was established, their effect on portal pressure was not assessed, and the improvement of liver fibrosis was relatively marginal in most of them.

Based on the accumulated clinical and experimental evidence, we believed that it was important to conduct a study to comprehensively assess the effects of long-term treatment of enoxaparin on liver fibrosis, systemic and hepatic hemodynamics, and systemic inflammation in different experimental models, and also, to initiate the administration of enoxaparin once liver cirrhosis was already established. This design would reflect better the clinical scenario on which new therapies are more urgently needed, and would assess in a more solid manner the ability of enoxaparin to improve

the natural history of liver cirrhosis. In this scenario, the selection of animal models that are reproducible and of an anesthetic regimen adequate for the measurement of hemodynamic parameters are two factors of paramount importance for optimizing the detection of the potential effects of enoxaparin.

AIMS

The GENERAL AIM of our study was to evaluate the effects of enoxaparin on central aspects of the natural history of cirrhosis, such as the development of liver fibrosis, portal hypertension and its complications. Our project included two preliminary studies, one addressed to choose the most reproducible model of cirrhosis induced by the oral administration of carbon tetrachloride (CCl₄), and another to choose the best anesthetic regimen for hemodynamic measurements *in vivo*.

Our SPECIFIC AIMS were:

I. The optimization of the experimental design:

Aim I.A: To compare the reproducibility of two protocols of liver cirrhosis induced by the oral administration of CCl₄ in rats, with respect to: i. Mortality; ii. Body weight gain; iii. Hematological, biochemical and liver function parameters; iv. Cardio-respiratory parameters; v. Development of portal hypertension and ascites; vi. Development of fibrosis and liver cirrhosis.

Aim I.B: To compare the effects of two anesthetic regimens (sevoflurane and Ketamine+Diazepam) in rats with and without prehepatic portal hypertension due to partial portal vein ligation, with respect to: i. General anatomic parameters; ii. Stability of anesthesia and need for dose adjustments; iii. Mortality during anesthesia; iv. Hematological, biochemical and gasometric parameters; v. Measurement of systemic hemodynamic parameters; vi. Measurement of portal pressure.

II. To assess the effects of enoxaparin, including different doses and using 3 experimental models of liver cirrhosis, on the following aspects of this disease:

Aim II.A: In rats with cirrhosis induced by the oral administration of CCl₄ or by bile-duct ligation (BDL), to assess its effects on: i. Mortality; ii. Body weight gain; iii.

Hematological and biochemical parameters; iv. Liver fibrosis; v. Cardio-respiratory parameters; vi. Development of portal hypertension and ascites; vii. Bacterial translocation and systemic inflammation.

Aim II.B: In rats with cirrhosis induced by inhalation exposure to CCl₄, to determine its effects on endothelial dysfunction both at the portal and the hepatic arterial beds.

METHODS

Aim I.A: The following substances were given by oral gavage to three groups of male Sprague-Dawley (S-D) rats for 12 weeks or until the occurrence of overt ascites: control group received water once a week (**CTRL**, n=11), rats from the Runyon's protocol received CCl₄ once a week (**CCl₄-[1xSem]**, n=12), and rats from the modified Regimbeau's protocol received CCl₄ twice a week (Monday and Friday) (**CCl₄-[2xSem]**, n=15). Dose adjustments of CCl₄ were based on changes in body weight. In the second or third week after the last dose of CCl₄, blood and tissue samples were taken after performing a hemodynamic study to measure portal, mean arterial (MAP) and central venous pressures.

Aim I.B: Forty-one male S-D rats were randomly divided into 4 groups based upon anesthetic exposure and partial portal vein ligation performance (PPVL): normal sevoflurane group (**CTRL-Sevo**, n=8), normal Ketamine+Diazepam group (**CTRL-KD**, n=11), PPVL sevoflurane group (**PPVL-Sevo**, n=9), and PPVL Ketamine+Diazepam group (**PPVL-KD**, n=13). A hemodynamic study was performed to measure blood pressures and to take blood and tissue samples. In PPVL rats, this study was performed 4 days after the surgery.

Aim II.A and B: Cirrhosis was induced in male S-D rats using 3 protocols: 1) Oral gavage with CCl₄ twice a week for 12 weeks according to the modified Regimbeau's protocol (developed in objective I.A of the present project); 2) Inhalation of CCl₄ twice a week for 12 weeks; 3) Bile duct ligation surgery. Rats (n=8-15/group) underwent daily subcutaneous treatment with saline or diverse protocols of enoxaparin: 40 U/kg bw from the 8th week of CCl₄, 180 U/kg bw from the 1st week or 8th week of CCl₄, and 180 U/kg bw from the 2nd week of BDL. Control groups of rats gavaged with water or sham-operated rats followed the same protocols. Portal pressure was measured in the

ileocolic vein and liver fibrosis was assessed in Sirius Red and Masson's trichrome stained liver sections and by the expression of the fibrosis-related genes *Col1a1* (type 1 collagen), *ACTA2* (alpha-smooth muscle actin) and *Timp1* (tissue inhibitor of metalloproteinases-1) in the liver. Spontaneous bacterial peritonitis was evaluated by culturing a sample of ascitic fluid in thioglycolate medium, and the systemic inflammatory response was assessed by measuring the circulating levels of IL-6. Single portal vein and bivascular liver perfusion experiments were performed for assessing endothelial dysfunction.

RESULTS

Aim I.A: Compared with **CTRL** and **CCl4-[1xSem]** groups, rats in the **CCl4-[2xSem]** group developed ascites more frequently (0% vs. 10% vs. 80%, $p < 0.01$), and had greater portal pressure (6.8 ± 1.5 vs. 9.9 ± 2.2 vs. 14.5 ± 2.7 mmHg, $p < 0.001$), splenomegaly (evaluated by the spleen weight/BW ratio: 0.16 ± 0.02 vs. 0.26 ± 0.11 vs. 0.34 ± 0.09 , $p < 0.001$), and thrombocytopenia (905 ± 93 vs. 865 ± 97 vs. $542 \pm 246 \times 10^3$ platelets / μ L, $p < 0.001$). Rats in the **CCl4-[2xSem]** group also showed a higher degree of liver atrophy (evaluated by the liver weight/body weight ratio; $p < 0.001$) and impaired liver function evaluated by glucose levels ($p < 0.01$), albumin ($p < 0.0001$), fibrinogen ($p < 0.001$), total bilirubin ($p < 0.01$) and INR ($p < 0.0001$). There was no difference in mortality between the **CCl4-[1xSem]** and the **CCl4-[2xSem]** groups (17% vs. 33%, $p = 0.41$).

Aim I.B: The two anesthetic regimens achieved an adequate depth of anesthesia in normal and portal hypertensive rats, and they had no influence on the measurement of portal pressure and MAP. However, rats anesthetized with Ketamine+Diazepam showed greater individual sensitivity with greater need for dose adjustments (50 vs. 17.6%, $p = 0.05$) and higher mortality (20.8 vs 0%; $p = 0.065$). The main analytical difference was an elevation of AST in rats anesthetized with Ketamine+Diazepam (**CTRL-Sevo**: 62 ± 24 UI/mL, **CTRL-KD**: 123 ± 33 UI/mL, **PPVL-Sevo**: 74 ± 32 UI/mL, **PPVL-KD**: 119 ± 31 UI/mL; $p = 0.007$), probably related to muscle necrosis secondary to the injection of large volumes of these anesthetics (150-435% higher than recommended).

Aim II.A: Compared with control groups, rats with oral CCl₄ gavage tended to show decreased survival and body weight gain, both of which were further worsened by enoxaparin at the 180 U/kg bw dose ($p < 0.01$). Rats with CCl₄-induced cirrhosis showed altered laboratory parameters (increased INR, AST, ALT, bilirubin / decreased albumin, total proteins, glucose and platelets) regardless of enoxaparin treatment. In all experimental models and in comparison to their respective controls, cirrhotic rats receiving saline or enoxaparin showed similar increases of the area of liver fibrosis and of the hepatic expression of fibrosis-related genes ($p < 0.001$). Rats with cirrhosis induced by oral CCl₄ gavage or by bile duct surgery had higher portal pressure and greater splenomegaly compared with control rats ($p < 0.001$), regardless of enoxaparin treatment. In both experimental models, the proportion of rats with ascites that developed spontaneous bacterial peritonitis was similar in those receiving saline and those receiving enoxaparin (**CCl₄-Saline** 2 of 7 vs. **CCl₄-LMWH** 4 of 8, NS; **BDL-Saline** 1 of 6 vs. **BDL-LMWH** 2 of 7, NS). The levels of circulating IL-6 were similar in these groups, irrespective of enoxaparin treatment.

Aim II.B: Relevant effects of enoxaparin on hepatic vascular reactivity were only observed in rats receiving enoxaparin at the 180 U/kg bw dose from the beginning of CCl₄ administration, and they consisted of higher portal venous resistance after addition of increasing doses of acetylcholine or S-nitroso acetylpenicillamine (SNAP, both $p < 0.05$) and increased sinusoidal resistance after addition of SNAP ($p < 0.05$).²

CONCLUSIONS:

1. The modified Regimbeau's protocol developed in our project constitutes a faster, more efficient and highly reproducible method for inducing liver cirrhosis, portal hypertension and ascites by the administration of CCl₄ compared with the classical Runyon's protocol, without associating an increased mortality.
2. The use of sevoflurane anesthesia is preferable to the anesthesia with Ketamine+Diazepam for performing systemic and hepatic hemodynamic studies in rats with or without portal hypertension due to: a) the increased anesthetic stability, b) the decreased associated mortality, c) the avoidance of intramuscular

injection of volumes higher than the recommended for small animals, which leads to probable muscular necrosis with ALT elevation, and d) its identical capacity for performing valid and precise measurements of portal pressure.

3. The chronic treatment with high or low doses of enoxaparin does not improve liver fibrosis, portal hypertension or endothelial dysfunction in diverse experimental models of advanced liver cirrhosis in the rat, suggesting that the protocol of administration and, most importantly, the stage of cirrhosis may be crucial factors for obtaining beneficial effects from its use.

6. INTRODUCCIÓN

La cirrosis hepática representa el estadio final de todas las enfermedades hepáticas crónicas progresivas y se define histológicamente como una distorsión de la arquitectura hepática con formación de nódulos de regeneración separados por tabiques fibrosos (1). La historia natural de la cirrosis hepática está marcada por la aparición de sus complicaciones, las cuales son consecuencia de tres procesos fundamentales: el desarrollo de hipertensión portal (HTP), la insuficiencia hepatocelular, y la aparición de hepatocarcinoma (2). A su vez, el desarrollo de HTP (presión portal > 5 mm Hg) es el principal responsable de importantes complicaciones clínicas como son la ascitis, la hemorragia digestiva alta por varices esofágicas, y la peritonitis bacteriana espontánea (3). Hasta hace poco, las estrategias terapéuticas se centraban en tratar la causa (p.ej. tratamientos antivirales) y prevenir o tratar las complicaciones asociadas a esta enfermedad (4, 5). Sin embargo, el mayor conocimiento de los mecanismos de desarrollo de la fibrogénesis y la acumulación de evidencias recientes indicando que la fibrosis puede ser revertida (4, 6-10), han estimulado la búsqueda de fármacos antifibrogénicos (9, 11, 12).

6.1. Hemostasia y anticoagulación en la cirrosis hepática.

La heparina no fraccionada (HNF) y la heparina de bajo peso molecular (HBPM) han sido objeto de considerable atención en estudios experimentales de fibrosis hepática (13-20). Además de su acción anticoagulante, la heparina posee una variedad de funciones que la convierten en una opción atractiva como posible tratamiento de enfermedades hepáticas crónicas (21). Dichas funciones incluyen propiedades antiinflamatorias (22-25) y antifibróticas (13-20), inhibición de la angiogénesis (26, 27), y mejoría de la disfunción endotelial (28, 29). Sin embargo, su uso en la cirrosis hepática es controvertido debido a que la cirrosis hepática ha sido considerada durante mucho tiempo un estado hipocoagulante (30). Estudios clínicos y experimentales realizados en las últimas dos décadas, sin embargo, han cuestionado este concepto al poner de manifiesto que la hemostasia en la cirrosis hepática mantiene un equilibrio precario, pudiendo presentar tanto un fenotipo hipo-

coagulante como protrombótico en presencia de un desencadenante determinado (p.ej. infección) (31). Este cambio conceptual se apoya en las siguientes observaciones:

- i. La cirrosis hepática, a diferencia de las coagulopatías hereditarias, afecta a todo el espectro de la coagulación (tanto factores procoagulantes como anticoagulantes), lo que da lugar a una “*hemostasia rebalanceada*” (Figura 1) (32-34).
- ii. Las pruebas de coagulación tradicionales (p.ej. tiempo de protrombina o tiempo parcial de tromboplastina) no reflejan adecuadamente este nuevo equilibrio hemostático, ya que no tienen en cuenta la inhibición de la trombina por factores anticoagulantes (31, 35). En un estudio reciente realizado en pacientes cirróticos compensados, la generación de trombina fue altamente variable pese a presentar los pacientes un rango de la Relación Normalizada Internacional (INR, International Normalized Ratio en sus siglas en inglés) muy estrecho (36). Las pruebas tradicionales tampoco valoran adecuadamente el riesgo de sangrado de varices esofágicas o el secundario a procedimientos invasivos, ni existe evidencia de que su corrección mejore su evolución o disminuya este riesgo (31, 35, 37-44).
- iii. El empleo de nuevas pruebas de coagulación que informan sobre el estado global de la coagulación ha revelado una generación normal e incluso aumentada de trombina en pacientes cirróticos con alteración de las pruebas de coagulación tradicionales (45-47).
- iv. El reconocimiento creciente de la existencia de complicaciones trombóticas en pacientes cirróticos tanto en el territorio venoso esplácnico (48-61) como periférico (62-70).
- v. La anticoagulación en pacientes cirróticos no parece aumentar ni el riesgo de episodios hemorrágicos (71-74) ni la mortalidad de este tipo de complicación (75).

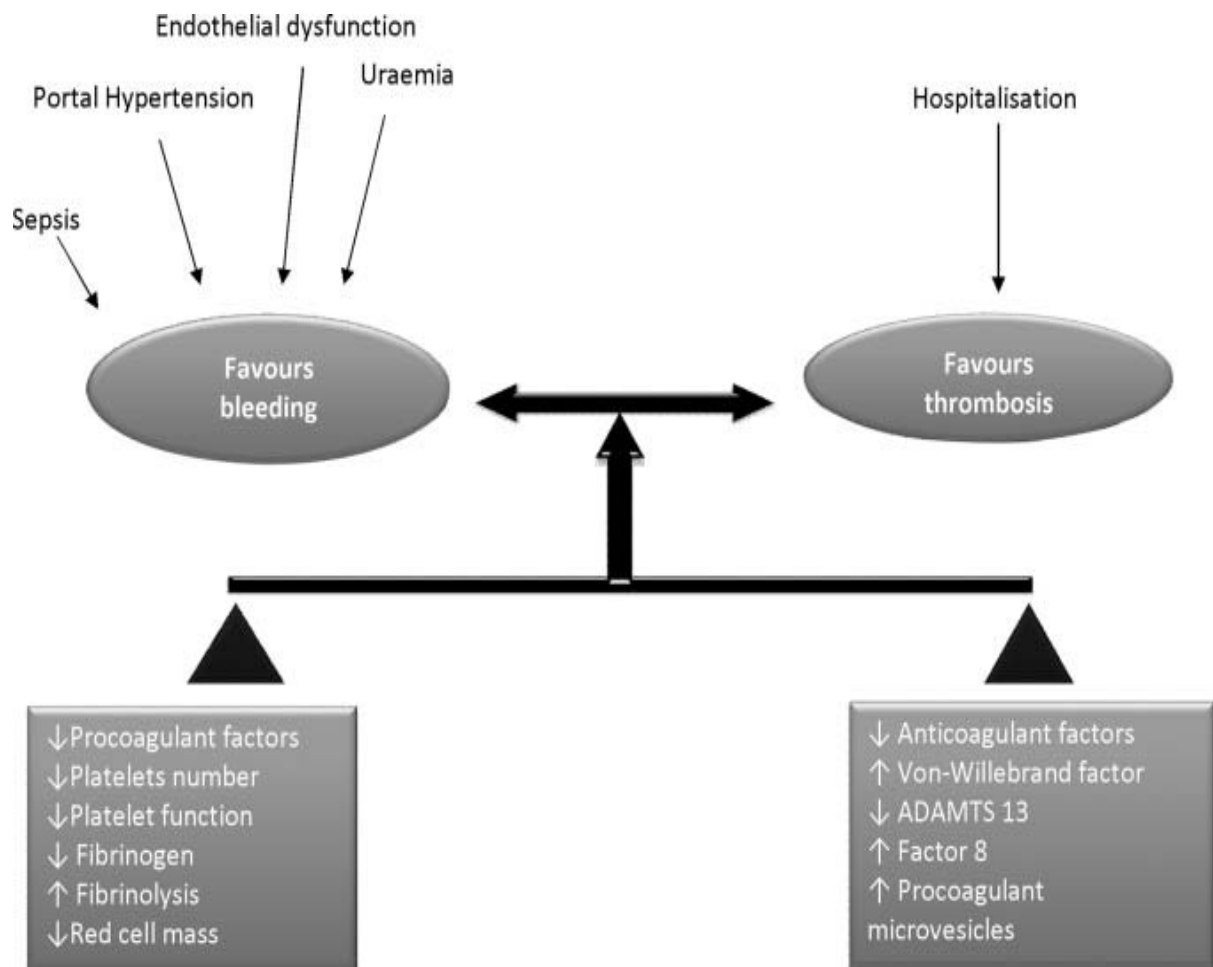


Figura 1: Hemostasia rebalanceada en la cirrosis hepática. La trombopenia y la disminución de factores de coagulación ocurren en paralelo a la reducción de factores anticoagulantes y al aumento de factores procoagulantes. El mantenimiento del equilibrio es precario por la escasa capacidad de compensación, pudiendo derivar tanto hacia un fenotipo protrombótico como hacia uno prohemorrágico ante la presencia de determinados factores. *Reproducido con permiso de Jairath *et al* (31).

6.2. Las alteraciones de la hemostasia influyen en la progresión de la enfermedad hepática.

Las alteraciones procoagulantes de la hemostasia asociadas a la cirrosis hepática se han implicado en la progresión de la fibrosis hepática a través de dos mecanismos principales (76-78) (Figura 2): i. Por la generación de trombos en la microvasculatura hepática que ocasiona una extinción parenquimatosa y fibrosis subsiguiente (79), y ii.

Por la activación de las células estrelladas por la trombina a través de su unión a receptores activados por proteasas (80, 81). Varios estudios clínicos observacionales apoyan este papel de la coagulación en la patogénesis de la fibrosis hepática. De esta manera, se ha objetivado un estadio más avanzado de la enfermedad hepática en presencia de factores protrombóticos en pacientes con hepatitis crónica viral (82-87) enfermedad hepática por depósito graso no alcohólica (88), y en la población general (89). Por el contrario, en pacientes hemofílicos infectados por el virus de la hepatitis C se observó una progresión más lenta de la fibrosis (90). En el ámbito experimental, un estudio realizado en ratones con mutaciones protrombóticas demostró una mayor progresión de la fibrosis hepática inducida por tetracloruro de carbono en comparación con ratones C57Bl6 salvajes (91).

6.3. La anticoagulación como posible tratamiento antifibrogénico en la cirrosis hepática.

Un considerable número de evidencias tanto clínicas como experimentales sugiere que las alteraciones de la hemostasia propias de la cirrosis hepática son una interesante diana terapéutica para prevenir o revertir la progresión de la enfermedad. En la última década, varios estudios experimentales han valorado la eficacia de diversos anticoagulantes, principalmente HNF y HBPM, en distintos modelos animales de cirrosis hepática e HTP (13-20, 91, 92) (ver resumidos en Tabla 1). En un estudio de referencia en este campo, Villa *et al.* objetivaron que la administración de dosis profilácticas de enoxaparina a pacientes cirróticos (Child B7-C10) fue eficaz no sólo para prevenir el desarrollo de trombosis portal (TP), sino que también retrasó la aparición de complicaciones características de la cirrosis y aumentó la supervivencia de los pacientes. El grupo tratado con enoxaparina tuvo además una mayor reducción de biomarcadores sanguíneos de daño intestinal y de activación inmune por productos bacterianos que el grupo placebo. Estos hallazgos hicieron sugerir a los autores que el efecto protector de la enoxaparina podría ser secundario a la mejoría de la microcirculación intestinal que a su vez mejoraría el daño enterocítico, y con ello disminuiría la translocación bacteriana (TB) (72).

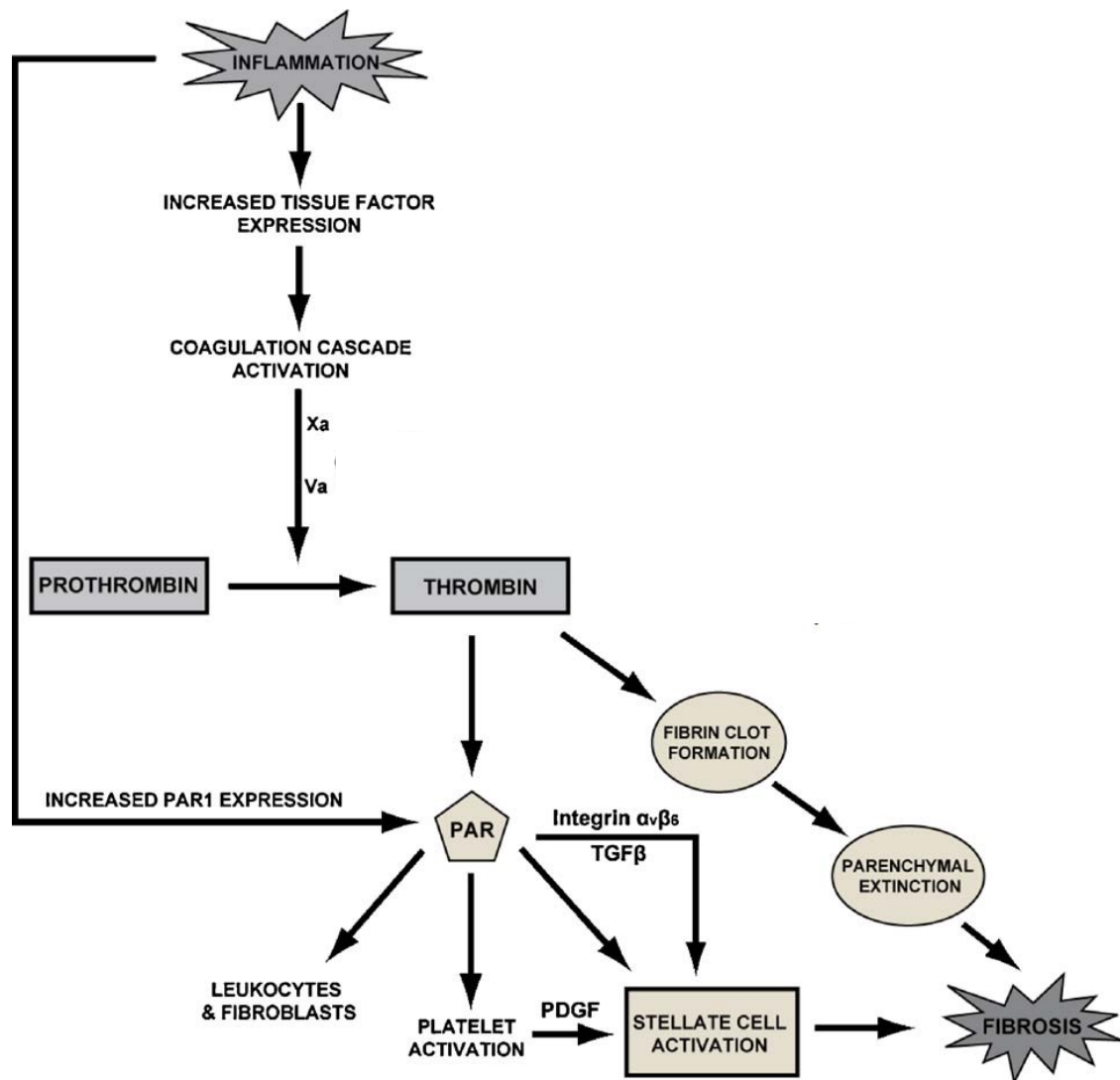


Figura 2: Posible papel de la coagulación en la progresión de la fibrosis hepática. La inflamación hepática aumenta la expresión del factor tisular y del receptor de la trombina, PAR1. Su activación podría promover la fibrosis hepática a través de la activación de las células estrelladas por medio de PAR1, y a través de microtrombosis vasculares que dan lugar a una extinción del parénquima irrigado por los vasos afectados. Abreviaturas: PDGF: platelet derived growth factor (factor de crecimiento derivado de las plaquetas); TGFβ: Transforming growth factor beta (Factor de crecimiento transformante beta). *Reproducido con permiso de Anstee *et al* (91).

Tabla 1. Principales estudios de terapias anticoagulantes en modelos experimentales de cirrosis hepática en roedores.

Ref.	Sexo/Cepa	Modelo animal	Anticoagulante/Dosis/Ruta y duración de la administración	Resultados
Nakao T. <i>et al</i> ; 2002 (13)	Ratas M Wistar	DMN seguido de ligadura de ramas portales ± resección de los lóbulos ligados (70 %)	<ul style="list-style-type: none">Heparina sódica 1000 IU/kg ipAdministrada cada 12 horas durante 24, 72 y 168 horas tras la ligadura	<ul style="list-style-type: none">La administración de heparina aceleró la regeneración hepática tras la ligadura portal, con un incremento asociado de los niveles plasmáticos de HGFTambién prolongó significativamente la supervivencia de las ratas cirróticas tras la hepatectomía. No se valoró el grado de fibrosis
Abdel-Salam O. <i>et al</i> ; 2005 (14)	Ratas M S-D	LC	<ul style="list-style-type: none">Heparina sódica 1000 IU/kg ipEnoxaparina 180 IU/kg ipNadroparina 1000 IU/kg ipTinzaparina 1000 IU/kg ipGrupo control: Salino <p>Se administraron diariamente a partir del séptimo día tras la cirugía, y se mantuvieron durante 3 semanas</p>	<ul style="list-style-type: none">Heparina sódica: incrementó significativamente la bilirrubina. No cambios en fibrosisEnoxaparina: en comparación con el grupo salino, redujo significativamente la bilirrubina, ALT, y fibrosisNadroparina: en comparación con el resto de grupos, redujo significativamente la bilirrubina, FA, GGT, y fibrosis.Tinzaparina: en comparación con el grupo salino, redujo significativamente la bilirrubina, pero incrementó la FA, GGT, y fibrosis.
Li W. <i>et al</i> ; 2006 (15)	Ratas M S-D	1) CCl4 sc 2) Suero porcino ip Ambos dos veces por semana durante 10 semanas	Heparinas de baja actividad anticoagulante ((HBAA), equivalente a HBPM))/ Dosis N.S./ ip Administradas diariamente hasta el sacrificio	<ul style="list-style-type: none">En ambos modelos las HBAA redujeron significativamente la fibrosis hepáticaTambién disminuyeron el número de células α-SMA en el modelo de CCl4
Abe W. <i>et al</i> ; 2007 (16)	Ratas H Wistar	CCl4 ip dos veces por semana durante 7 semanas	Dalteparina 50 IU/kg ip diariamente durante 7 semanas	<ul style="list-style-type: none">Dalteparina redujo significativamente la fibrosis incrementando los niveles de HGF, disminuyendo los de TGF-β1 e inhibiendo directamente la proliferación de células estrelladas hepáticas
Assy N. <i>et al</i> ; 2007 (17)	Sexo N.S. S-D	Tioacetamida ip dos veces por semana durante 5 semanas. Posteriormente 1 vez por semana durante otras 5 semanas	<ul style="list-style-type: none">Enoxaparina 200 IU/Kg scAspirina 300 mg/Kg oralAdministrado diariamente desde la semana 6 a la 10	<ul style="list-style-type: none">Enoxaparina y aspirina redujeron la fibrosis en un 36 y 43 %, respectivamente. Usaron una escala semicuantitativa (METAVIR)La regeneración hepática se mejoró significativamente en el grupo de la aspirina, sin modificarse en el de la enoxaparina

Tabla 1. Principales estudios de terapias anticoagulantes en modelos experimentales de cirrosis hepática en roedores.

Ref.	Sexo/ Cepa	Modelo animal	Anticoagulante/Dosis/Ruta y duración de la administración	Resultados
Kukner A. <i>et al</i> ; 2010 (18)	Ratas M S-D	CCl4 ip dos veces por semana durante 4 semanas	Enoxaparina 180 IU/kg sc diariamente durante las 4 semanas	<ul style="list-style-type: none">Enoxaparina redujo la apoptosis y necrosis. También previno el incremento de mastocitos y redujo el número de células de Kupffer activadas en las etapas tempranas del daño inducido por CCl4 (Ningún grupo desarrolló fibrosis hepática significativa)
Lee JH. <i>et al</i> ; 2011 (19)	Sexo N.S. S-D	DMN 1% (1 ml/Kg) ip durante 3 días consecutivos a la semana durante un total de 4 semanas	<ul style="list-style-type: none">Fraxiparina 1000 IU/kg ipHBPM-nanogel (LHP) 1000 IU/kg ip Ambos administrados diariamente durante 4 semanas	<ul style="list-style-type: none">LHP previno la pérdida de peso hepático y redujo los valores de transaminasas y bilirrubina. También disminuyó la expresión del ARNm del VEGF y la fibrosis hepática a través de una inhibición de la vía TGF-β/Smad. También redujo los niveles de expresión de MMP-2 y TIMP-1Fraxiparina también tuvo estos efectos beneficiosos, pero en menor medida, y sin afectar los valores de transaminasas y bilirrubina
Shah B. <i>et al</i> ; 2012 (20)	Ratas M Wistar	CCl4 0,375 mL/kg vía orogástrica tres veces por semana durante un total de 7 semanas	Heparina 2000 IU/Kg iv desde la semana 2 a la 7 (6 semanas)	<ul style="list-style-type: none">Heparina redujo las enzimas de colestasis y citolisis, e incrementó los niveles de fibrinógeno. También redujo la fibrosis, aunque la técnica utilizada para ello fue la hematxilina y eosina
Cerini F. <i>et al</i> ; 2013 (92)	N.S.	CCl4 inhalado durante 8 semanas	Enoxaparina 180 IU/Kg sc diariamente durante la semana posterior al fin de CCl4	<ul style="list-style-type: none">Enoxaparina redujo significativamente la presión portal, fibrosis y la expresión de α-SMA

Abreviaturas: Ref: referencia; N.S.: no especificado; DMN: dimetilnitrosamina; HGF: hepatic growth factor (factor de crecimiento hepatocitario); ALT: alanina aminotransferasa; FA: fosfatasa alcalina; GGT: gamma glutamil transpeptidasa; HBPM: heparina de bajo peso molecular; α-SMA: α-smooth muscle actin (alfa actina del músculo liso); TGF-β1: Transforming growth factor beta 1 (Factor de crecimiento transformante beta 1); ARNm: ácido ribonucleico mensajero; MMP-2: metaloproteinasa de matriz 2; TIMP-1: inhibidor tisular de la metaloproteinasa 1; ip: intraperitoneal; iv: intravenoso; im: intramuscular; BDL: ligadura del colédoco; CCl4: tetradoruro de carbono; M: macho; H: hembra; S-D: cepa Sprague-Dawley

Estas evidencias clínicas y experimentales establecen la base racional para evaluar el uso de terapias anticoagulantes en la cirrosis hepática. A pesar de diferencias metodológicas significativas, los estudios experimentales comparten dos características importantes: 1) la administración del fármaco anticoagulante se inició antes de que se estableciese una cirrosis hepática, y 2) la valoración de su eficacia se centró en su efecto antifibrótico. Un diseño alternativo interesante sería administrar el fármaco una vez estuviese establecida la cirrosis hepática, y valorar conjuntamente su efecto sobre la translocación bacteriana y la fibrosis y hemodinámica hepáticas. Este diseño reflejaría mejor el escenario clínico sobre el que es más necesario actuar, y permitiría valorar de forma más precisa la capacidad de estos fármacos para modificar la historia natural de la cirrosis hepática.

6.4. Modelos animales de cirrosis hepática e hipertensión portal

Gran parte de los conocimientos sobre la fibrogénesis hepática y sobre los mecanismos implicados en el desarrollo de HTP provienen de estudios de experimentación animal (93-95). La identificación de la influencia de cambios en la degradación de la matriz extracelular para la progresión de la fibrosis hepática (96) o de la contribución del hiperaflujo portal para la perpetuación y agravamiento de la HTP (97) son dos ejemplos representativos de la importancia de los modelos animales en la investigación biomédica. Su empleo permite investigar las diversas facetas de las enfermedades humanas (etiología, fisiopatología, diagnóstico y tratamiento) a través de diseños y de una metodología de difícil implementación en estudios humanos. La nueva Directiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos establece las directrices a seguir en todo estudio de experimentación animal (98). Esta directiva se basa firmemente en el principio de las tres Rs (reemplazar, reducir y refinar) que Russell y Burch propusieron en 1959 (99). El primero de ellos hace referencia a la utilización de métodos que eviten o sustituyan a los animales vivos. Puede tratarse de un reemplazo *absoluto* en el que se sustituyen por modelos informáticos, o *relativo* en el que se utilizan métodos *in vitro* (p.ej. cultivos celulares, láminas de tejidos u órganos) u organismos inferiores no

protegidos (p.ej. bacterias, hongos, o algunos invertebrados). El principio de reducir persigue utilizar el menor número de animales para obtener la información deseada, mientras que el principio de refinar pretende disminuir la incidencia y severidad de los procedimientos a realizar en los animales (100). Atendiendo a estos principios, si se ha de utilizar un modelo animal, habrá que balancear su efectividad para reproducir la enfermedad a estudio (lo que permitirá disminuir el número de animales) con su severidad.

El objetivo último de los estudios de experimentación animal es generar resultados válidos que puedan ser extrapolados a la especie humana. Sin embargo, es importante resaltar que ningún modelo animal puede simular completamente la enfermedad humana a estudio, y que en muchas ocasiones la respuesta a un determinado fármaco o intervención puede ser muy diferente en humanos y animales (95, 101). Los modelos animales de cirrosis hepática y de HTP no son una excepción. Así por ejemplo, la mayoría de ellos inducen una fibrosis que se inicia en las áreas pericentrales, y que posteriormente se extiende a los espacios portales, mientras que sucede a la inversa en humanos (salvo en los casos de HTP posthepática). Asimismo, ninguna de las dos causas más frecuentes de enfermedad hepática en Occidente (alcohol y virus de la hepatitis C) pueden ser utilizados para inducir cirrosis hepática en roedores, ya que este virus no infecta a estos animales y éstos presentan tanto una aversión al alcohol como una resistencia a desarrollar fibrosis como consecuencia de su consumo (95). Finalmente, la inducción de cirrosis hepática e HTP en modelos animales se realiza en un periodo de tiempo muy corto en comparación con lo que ocurre en humanos (semanas vs. años) (101). Estas razones, junto con las diferencias generales entre la fisiología y metabolismo animal y el humano, hacen que la extrapolación directa de los resultados sea peligrosa y que siempre se deba intentar corroborarlos en estudios realizados en seres humanos. Una vez asumidas sus limitaciones, en la elección del modelo experimental se han de tener en cuenta consideraciones de índole general aplicables a cualquier modelo de enfermedad, como la reproducibilidad, especificidad y seguridad de cada modelo (**Tabla 2**), y también consideraciones específicas del trastorno fisiopatológico concreto que se quiera estudiar, ya que no todos los modelos de una determinada enfermedad expresan de forma completa todas sus características

fisiopatológicas (93). A modo de ejemplo, la cirrosis hepática inducida por la administración de tetracloruro de carbono (CCl₄) es el modelo más utilizado para el estudio de las alteraciones de la microcirculación hepática características de esta enfermedad, mientras que la ligadura del colédoco (LC) es el único que desarrolla alteraciones similares a las del síndrome hepatopulmonar. La **Tabla 3** proporciona información sobre la utilidad de los modelos animales más frecuentemente empleados para el estudio de la HTP (ligadura parcial de la porta (LPVP), LC, y CCl₄) en función del trastorno fisiopatológico que se quiera investigar (93).

Tabla 2: Factores generales a tener en cuenta en la elección de un modelo experimental.

1. **Reproducibilidad:** porcentaje de animales que alcanzan el estado deseado.
2. **Especificidad:** el modelo debería tener la anormalidad deseada, sin presentar otras complicaciones.
3. **Coste:** se ha de tener en cuenta no sólo el coste directo del animal, sino también los costes de estabulación (y por tanto del tiempo de inducción de la enfermedad). Un modelo caro pero fiable, puede ser a la larga más barato que uno barato y poco fiable.
4. **Seguridad:** el animal y el método de inducción de la enfermedad no deben suponer un riesgo para el personal.
5. **Tamaño:** se debe tener en cuenta a la hora de minimizar los costes de los fármacos a utilizar (preferible animales más pequeños), pero también la facilidad de manipulación, por ejemplo a la hora de conseguir un buen acceso vascular (preferible animales más grandes).
6. **Aspectos éticos:** diferentes comités de investigación animal pueden tener diferentes visiones sobre la aceptabilidad de un modelo.
7. **Factibilidad:** evaluar si el laboratorio tiene la posibilidad material (personal, instalaciones, etc.) de generar y manejar el modelo.
8. **Otras:** edad y uniformidad genética de los organismos utilizados, conocimiento y similitud de la biología del organismo con la especie humana, y número de individuos necesarios.

Adaptado de Abrales y García-Pagán (93)

Tabla 3: Utilidad de los principales modelos animales disponibles para el estudio de los diferentes aspectos de la fisiopatología de la hipertensión portal.

TIPO DE ESTUDIO	LPVP	LC	CCI4
Alteración de la microcirculación hepática en la cirrosis	-	++ Escasa experiencia	+++
Fisiopatología de la circulación hiperdinámica	+++	+++	+++
Secuencia temporal de alteraciones implicadas en la circulación hiperdinámica	+++	++	+
Fisiopatología de la ascitis	+	++	+++
Alteraciones en la circulación mesentérica	+++	++	+++
Circulación colateral	+++	+++	+++
Gastropatía de la hipertensión portal	+++	+++	+++
Síndrome hepatopulmonar	-	+++	-
Modelo de hemorragia por hipertensión portal	++	+++	+++

Abreviaturas: LPVP: ligadura parcial de la porta; LC: ligadura del colédoco; CCI4: tetracloruro de carbono. Adaptado de Abraldes y García-Pagán (93)

Atendiendo a la clasificación de severidad de los procedimientos experimentales (**Tabla 4**), estos 3 modelos de HTP pueden considerarse como procedimientos con una categoría de severidad moderada en el caso del modelo de LPVP, y moderada-severa en los dos restantes. La aplicación de un protocolo de supervisión adecuado y de criterios de punto final claramente definidos, permite rebajar la severidad de los modelos de LC y CCI4 a moderada (102).

6.4.1. Ligadura parcial de la porta (LPVP)

La LPVP constituye un modelo animal de HTP pre-hepática que ha sido ampliamente utilizado. Este modelo quirúrgico se ha caracterizado en varias especies animales (ratones, ratas, conejos) (93, 103), pero los estudios más relevantes se han realizado en ratas (97, 104-106). Tras realizar una estenosis calibrada de la vena porta, los animales desarrollan de forma completa el síndrome de hipercirculación hiperdinámica esplácnica y sistémica a partir del cuarto día de la ligadura. El desarrollo

completo de circulación colateral porto-sistémica es más tardío, requiriéndose al menos 8 días, aunque es evidente a partir del segundo día (104).

Las principales ventajas del modelo de LPVP son su seguridad, facilidad técnica, alta reproducibilidad y bajo coste. Si bien la rapidez de instauración del síndrome de HTP ha contribuido a su amplia utilización, ha de tenerse en cuenta que este síndrome rara vez se produce de forma tan aguda en la clínica (93). El origen pre-hepático de la HTP y la preservación de la función hepática limitan la utilidad de este modelo para el estudio de otras alteraciones propias de este síndrome (alteración de la circulación intrahepática) o de la fibrogénesis.

Tabla 4: Categorías de severidad de procedimientos experimentales (98).

-
- **No recuperación:** procedimientos que se realizan enteramente bajo anestesia general tras la cual el animal no recuperará la conciencia (p.ej. recogida de órganos).
 - **Leve:** procedimientos donde es probable que se experimente dolor, sufrimiento o angustia leves de corta duración, así como procedimientos sin alteración significativa del bienestar o del estado general de los animales (p.ej. administración de sustancias con el pH y volumen adecuados).
 - **Moderado:** procedimientos donde es probable que se experimente dolor, sufrimiento o angustia moderados de corta duración, o leves pero duraderos, así como procedimientos que pudieran causar una alteración moderada del bienestar o el estado general de los animales (p.ej. administración frecuente de sustancias y extracción de muestras sanguíneas (> 10 %) en intervalos de días o acumulación de leves).
 - **Severo:** procedimientos donde es probable que se experimente dolor, sufrimiento o angustia intensos, o moderados pero duraderos, así como procedimientos que pudieran causar una alteración grave del bienestar o el estado general de los animales (p.ej. estudios de toxicidad o quimioterapia o acumulación de moderados).
-

6.4.2. Ligadura del colédoco (LC)

La LC y la administración de CCl₄ constituyen los dos modelos más utilizados para el estudio de la fibrogénesis hepática (94). Inicialmente desarrollados en ratas, posteriormente se ensayaron también en ratones, dada la mayor posibilidad de manipulación genética en esta especie (107). La LC es un modelo clásico de cirrosis biliar secundaria cuya técnica habitual consiste en disecar el colédoco de la grasa subyacente, realizando en el mismo una doble ligadura (craneal al conducto pancreático y distal a la unión de los conductos hepáticos) seguido de la sección de la porción que queda entre las dos ligaduras (93, 95, 101, 107, 108). Tanto en el modelo LPVP como LC, los animales controles son sometidos a una laparotomía y manipulación de los vasos/conductos implicados en cada modelo, pero sin realizar ligadura o sección de los mismos (95, 101, 104). A diferencia de las ratas que carecen de vesícula, los ratones pueden sufrir una distensión y perforación vesicular secundarias a esta técnica, lo que obliga a realizar en el mismo acto quirúrgico una colecistectomía o colocación de un clip en el cístico para prevenirlo (93, 95, 101, 107, 108). Otra complicación de esta técnica es la formación de un gran quiste biliar que, al comprimir el hilio hepático, puede causar una HTP prehepática. Para evitarlo se han propuesto varios métodos: inyección de formol (109) o Ethibloc® (110) (sustancia utilizada para embolizaciones en radiología intervencionista) en la vía biliar antes de realizar la ligadura, o la realización de una ligadura y sección individual del conducto hepático de cada lóbulo (111).

La LC produce en el hígado una infiltración de células inflamatorias en zonas de infarto biliar y espacio porta como consecuencia de la toxicidad biliar, además de una marcada proliferación colangiolar con fibrosis portal expansiva. Pese a ello, no suelen objetivarse las alteraciones arquitecturales típicas de la cirrosis humana no colestásica (93, 95, 101, 112). Es de destacar que existe una importante variabilidad en la respuesta fibrogénica en función de la especie (las ratas son más susceptibles al daño que los ratones) y cepa, no debiéndose realizar en ratones con alteración de la cicatrización o disfunción inmune (107, 113). Los animales sometidos a esta técnica desarrollan precozmente hipertensión portal (a partir de las 2 semanas), la cual tiene

un importante componente presinusoidal. A partir de la cuarta semana aparecen las manifestaciones típicas del síndrome de circulación hiperdinámica, ascitis (aproximadamente en un 60 %), y *shunting* portosistémico de un 30-50% (93, 95, 114, 115). Esta técnica requiere una curva de aprendizaje que evite una mortalidad precoz debida a fallos técnicos de la cirugía (fuga biliar, ruptura del quiste biliar o vesícula). Aún dominando la técnica quirúrgica, la mortalidad resultante de la gravedad de la enfermedad hepática llega a exceder el 20 % a partir de la quinta-sexta semana en ratas y de la cuarta semana en ratones (93, 95, 101). Se ha descrito una regresión de la fibrosis en ratas sometidas a LC tras realizar una anastomosis bilio-intestinal, por lo que este modelo se ha utilizado para estudiar la regresión de la fibrosis (116-118).

6.4.3. Cirrosis inducida por la administración de CCl₄

El CCl₄ es un compuesto químico sintético que ha sido ampliamente utilizado para manufacturar líquidos refrigerantes y propulsores para aerosoles. También ha sido empleado como extintor de incendios, plaguicida, y como líquido de limpieza en la industria (como agente desengrasante) y en el hogar. A principios del siglo XX, se llegó incluso a utilizar como anestésico y para tratar infecciones intestinales por Helminthos. Debido a su toxicidad y al descubrimiento de que afecta negativamente a la capa de ozono, su uso ha ido disminuyendo progresivamente desde mediados de la década de los sesenta (119, 120). Pese a ello, constituye una de las sustancias tóxicas más utilizadas para inducir cirrosis hepática en modelos animales (93, 95, 101, 102, 107, 108, 121). Su efecto hepatotóxico es consecuencia de su metabolismo por el citocromo P-450 (fundamentalmente CYP2E1), una enzima que se expresa predominantemente en los hepatocitos de la región perivenular. La coadministración de fenobarbital (PHE), un inductor de CYP2E1, es utilizado para potenciar el metabolismo del CCl₄, y con ello su hepatotoxicidad (95, 101). Los metabolitos reactivos resultantes (tricloruro de metilo y tricloroperoximetilo) producen daño celular a través de peroxidación lipídica (que da lugar a un aumento de la permeabilidad de la membrana celular y de las organelas citoplasmáticas), alquilación de ácidos nucleicos y proteínas, pérdida de la homeostasis del calcio intrahepatocitario e inducción de citocinas inflamatorias (102,

120, 122). La Figura 3 resume estos mecanismos moleculares de hepatotoxicidad del CCl₄ (102).

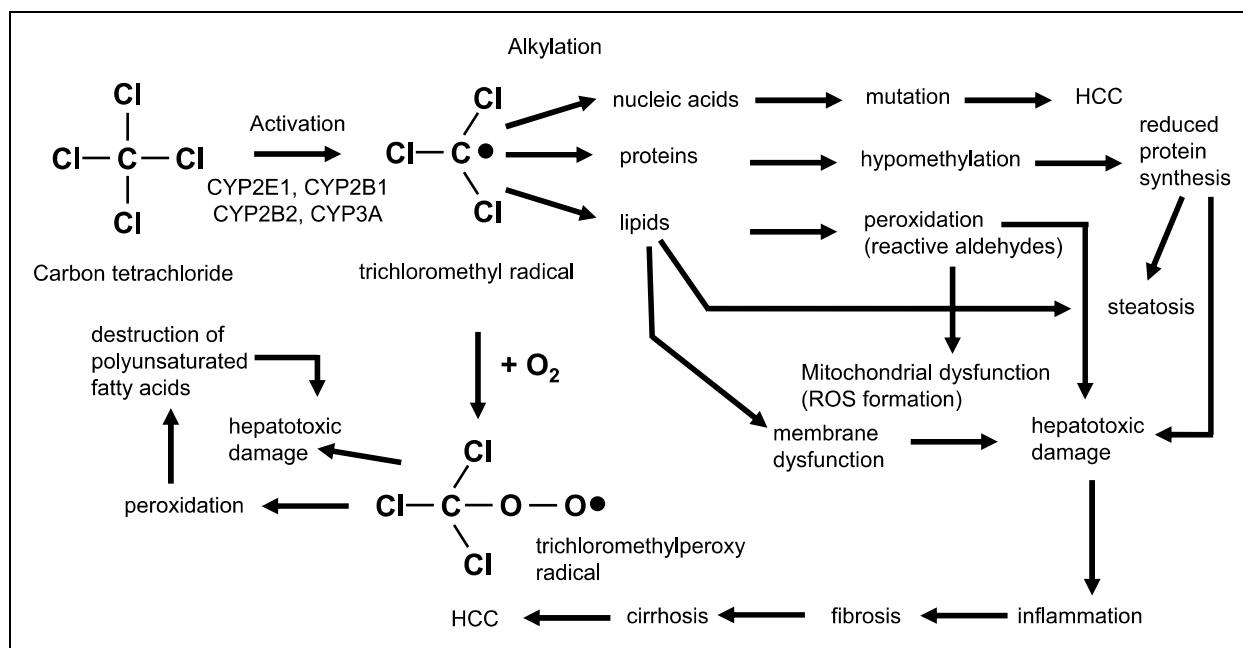


Figura 3: Mecanismos moleculares de hepatotoxicidad inducida por tetracloruro de carbono (CCl₄). En el hígado, el CCl₄ es metabolizado por enzimas del Citocromo P450 en un radical de tricloruro de metilo que puede ser posteriormente transformado mediante procesos de oxigenación en tricloroperoximetilo. Estos dos radicales son altamente reactivos e inducen alteraciones celulares complejas que conducen a daño hepatocelular, inflamación, fibrosis, cirrosis y carcinoma hepatocelular (HCC). *Reproducido con permiso de Scholten *et al* (102)

La lesión histológica resultante se caracteriza por una necrosis centrolobulillar sin apenas afectación extrahepática, dado que CYP2E1 se expresa pobremente en otros tejidos (95, 101, 107). Su administración continua en ratas y ratones conduce al desarrollo de cirrosis hepática micronodular, HTP, shunting portosistémico (aproximadamente 30-60 %) (123), y síndrome de circulación hiperdinámica en un tiempo variable que puede oscilar entre 6 y 15 semanas en función del protocolo que se utilice. El desarrollo de ascitis requiere más tiempo (7-20 semanas) (102, 124-135). Los estudios hemodinámicos, histológicos y moleculares se suelen realizar pasados al menos 2 días (generalmente una semana) de la última dosis de CCl₄ para evitar que la necrosis aguda e inflamación sistémica subsiguiente a cada dosis de CCl₄ puedan alterar los resultados (93, 95, 101). Retrasar el sacrificio más de una semana puede resultar en una mejoría de la fibrosis. De hecho, el modelo de CCl₄ ha sido

ampliamente utilizado para estudiar la regresión de la fibrosis (117, 136-140). Sin embargo, la capacidad de mejoría de la fibrosis depende fundamentalmente de la gravedad del daño existente, de forma y manera que la regresión de la fibrosis es limitada una vez instaurada una cirrosis descompensada (p.ej. desarrollo de ascitis). Así, la cirrosis micronodular puede revertir a una macronodular, pero la normalización de la arquitectura hepática es improbable debido probablemente a cross-linking en moléculas de la matriz extracelular (10, 136, 139). La gravedad y rapidez de instauración del daño hepático puede variar en función de la especie animal, cepa, dosis, ruta y frecuencia de administración de CCl₄ (95, 101, 107). Así por ejemplo, la cepa de ratones BALB/c es susceptible, mientras que las cepas FVP/N, A, C3H/He, y AKR son resistentes a la inducción de fibrosis por CCl₄ (102, 108).

Tabla 5: Medidas de almacenamiento de CCl₄ y medidas de protección (141).

- A. *Almacenamiento:* separado de metales, y almacenado en lugar fresco y con ventilación a ras del suelo
- B. *Medidas de protección para el personal investigador*
- 1) Protección cutánea:
 - Uso de guantes y traje de protección, pantalones gruesos, y zapatos cerrados
 - Lavado posterior de las manos
 - 2) Protección respiratoria:
 - Manipulación en campana extractora/gases y/o
 - Mascarilla de protección
 - 3) Protección ocular:
 - Pantalla facial o gafas protectoras
-

La manipulación del CCl₄ requiere tomar unas medidas de protección para evitar la exposición al CCl₄ por parte del personal investigador (**Tabla 5**) (141). El CCl₄ se puede administrar por varias rutas (intraperitoneal, inhalatoria, intragástrica, o subcutánea). Las tres primeras son las más eficaces, mientras que la última no se recomienda por la menor frecuencia de desarrollo de cirrosis hepática (93, 142). Esta vía, al igual que la intraperitoneal y orogástrica, utiliza aceite de maíz (139) u oliva (143) para disolver el CC₄, aunque también puede ser mezclado en agua. En nuestra opinión, de esta última

forma se puede disminuir el riesgo de exposición al CCl₄ al investigador, ya que al ser el CCl₄ una sustancia hidrófoba, se deposita en la mitad inferior dificultando o impidiendo la salida de vapores. Independientemente del método empleado, su administración provoca una reacción local inflamatoria que puede conducir a una necrosis tisular de menor o mayor gravedad, pudiendo comprometer la salud del animal y/o alterar los resultados del proceso a estudio (95, 101). Así, la administración intraperitoneal puede dar lugar a adherencias intraperitoneales que dificulten o impidan realizar estudios hemodinámicos o estudiar procesos como la ascitis (144, 145). Algunos autores prefieren la vía inhalatoria para evitar esta complicación y por ser menos invasiva que las anteriores, aunque requiere un equipamiento más complejo y costoso, además de presentar un mayor riesgo de exposición al CCl₄ para el personal investigador (95, 101, 102). La administración orogástrica es desaconsejada por algunos autores por estar asociada a una mayor mortalidad (102, 107, 121). Sin embargo, solo unos pocos estudios han comparado directamente la mortalidad y eficacia en inducir cirrosis hepática en función de la vía de administración del CCl₄. En ratas, solo tenemos conocimiento de tres estudios. El primero y más antiguo de ellos, comparó la administración orogástrica con la inhalatoria, siendo esta última mucho más segura (146), aunque es de destacar que otros estudios con dosis similares de CCl₄ administrados por vía orogástrica no tuvieron tasas de mortalidad tan altas (129, 147). Los otros dos estudios compararon la administración oral con la intraperitoneal, siendo la primera de ellas mejor tolerada, más segura y más eficaz en inducir cirrosis hepática (127, 134). En ratones, un estudio reciente comparó las rutas intraperitoneal, subcutánea e inhalatoria, siendo esta última la más segura y eficiente en inducir cirrosis hepática con ascitis asociada (144). La ventaja teórica de la administración oral es que provoca que la mayor parte de la dosis del CCl₄ llegue al hígado a través de la vena porta antes de alcanzar la circulación sistémica, exponiendo así al hígado al CCl₄ durante un mayor tiempo y minimizando aún más los efectos extrahepáticos de esta sustancia (124). Con independencia de la ruta o protocolo utilizado, la principal desventaja de este modelo es la diferente sensibilidad de cada animal a este compuesto químico, que da lugar a una baja reproducibilidad y explica la gran variabilidad de protocolos elaborados con intención de mejorar su eficiencia para

inducir cirrosis hepática (93, 142). Proctor y Chatamra propusieron solucionar este problema individualizando la dosis de cada animal de acuerdo con el efecto de la dosis anterior, evaluada en función de la ganancia o pérdida de peso corporal (PC) diaria (124). Desde entonces, varios protocolos de cirrosis hepática utilizando CCl₄ por vía orogástrica se han desarrollado basándose en esta individualización de la dosis de CCl₄ (125, 126, 148). Uno de los más utilizados actualmente es aquel diseñado por Runyon *et al.* Estos autores desarrollaron un modelo de cirrosis hepática descompensada en el que las ratas presentaron ascitis y peritonitis bacteriana espontánea en un 92,7 y 55,3 %, respectivamente, en un rango de 6 a 20 semanas de administración de CCl₄ por vía oral. La mortalidad de este protocolo fue elevada, de un 52,7 % (148). Estudios posteriores confirmaron su eficacia para inducir cirrosis hepática, su alta mortalidad (30-58 %), y la duración variable, pero generalmente larga, para el desarrollo de ascitis (6-19 semanas) (149-153). La **tabla 6** muestra estos y otros estudios con diferentes protocolos de inducción de cirrosis hepática por medio de la administración orogástrica de CCl₄. Se puede observar de nuevo la gran variabilidad existente en términos de eficacia en inducir cirrosis hepática y ascitis, así como en la duración necesaria para ello y su mortalidad asociada. Por consiguiente, y en coherencia con los principios de reducir y refinar, existe una necesidad de mejorar la reproducibilidad, duración y mortalidad asociada al modelo de cirrosis inducido por CCl₄.

Tabla 6: Protocolos de inducción de cirrosis hepática mediante la administración orogástrica de CCl4 en ratas.

Referencia	Sexo/Cepa/ PC inicial (gr)	Inducción con fenobarbital	Intervalo de administración	Dosis de CCl4	Semanas de CCl4	Porcentaje de cirrosis y ascitis*	Mortalidad/Observaciones
Proctor E y Chatamra K; 1982 (124)	M/Wistar/ ~ 150	10-14 días de PHE en el agua (35 mg/dl) antes de la administración de CCl4 y posteriormente	Semanal	Dosis inicial: 0,04 ml	8-10	74% desarrollaron ascitis	No especifican ni la mortalidad ni concretan cómo se debe realizar el ajuste de dosis en función de los cambios en PC. Otros estudios que han utilizado este protocolo:
							• Varin F. et al, 1985 (154): ascitis 86 % y mortalidad 30 % después de 8-15 semanas. Ratras M S-D.
				Dosis posteriores: ajustados a los cambios diarios de PC			• Fisher-Nielsen .et al, 1991 (139): cirrosis 100 %, pero solo un 22 % desarrollaron ascitis después de 12 semanas. Ratras M Wistar. Mortalidad del 19 %.
							• Gold EJ et al, 2003 (155): tras 10 semanas la mediana de la escala de Ischack fue 5,8. Mortalidad N.S. Ratras M Lewis.
Nakatsukasa H et al, 1990 (156)	M/Fisher/ ~ 200	Pellets con 0,05 % de PHE 1 semana antes de CCl4 y posteriormente	Semanal	Dosis inicial y posteriores: 0,33 ml/kg	12	Desarrollo de cirrosis a partir de la semana 8 (% N.S.). Ascitis N.S.	Mortalidad N.S. Da información sobre la cinética de desarrollo de cirrosis. Sacrificaron a distintos tiempos: 1, 2, 4, 6, 8, 10, y 12 semanas
Rosa H. et al; 1991 (125)	M/Wistar/ 180-220	No	Semanal	Dosis inicial: 0,04 ml	8-12	100 % desarrollaron cirrosis tras 10 semanas, pero ninguna mostró datos de HTP o ascitis	Mortalidad del 20 %. Es una modificación del protocolo de Proctor y Chatamra. Para desarrollar ascitis se requería más tiempo (14-16 semanas)
				Dosis posteriores: en función de los cambios en el PC a los 7 días tras CCl4			
				Dosis inicial: 0,04 ml			
Mellencamp MA. et al, 1991 (126)	M/S-D/ 120-140	1,5 mmol/L de PHE en el agua 10-14 días antes de la administración de CCl4 y posteriormente	Semanal	Dosis posteriores: ajustado a los cambios en PC a las 48 hr. tras CCl4. Cesaban su administración al desarrollar ascitis antes de semana 12	8-12	76 % desarrollaron ascitis	Mortalidad del 17 %, generalmente dentro de las 3 primeras semanas. Es una modificación del protocol de Proctor y Chatamra. Incluyeron a un número elevado de ratas (n=312)
Runyon BA. et al, 1991 (148)	M/S-D/ 100-120	1,5 mmol/L de PHE en el agua 10-14 días antes de la administración de CCl4 y posteriormente	Semanal	Dosis inicial: 0,02 ml	6-20	92,7 % desarrollaron ascitis. De éstas, 55,3% desarrollaron también datos de PBE	Mortalidad del 52,9 %, generalmente dentro de las 4 primeras semanas. Es un modelo de PBE, basado en el protocolo de Mellencamp et al. Otros estudios que han utilizado este protocolo:
							• Llovét JM. et al, 1994 (149): ascitis 100 % y mortalidad del 58 % tras 7-19 semanas. Ratras M S-D.
				Dosis posteriores: ajustado a los cambios en PC a las 48 hr. tras CCl4. Una vez desarrollado ascitis se administraba 40 µl de CCl4 semanales			• Guarner C. et al, 1999 (150): ascitis 95,2 % (35 % también PBE) y mortalidad del 30 % tras 10,4 semanas (SD 2,1). Ratras M S-D.
							• Pérez-Páramo M. et al, 2000 (151): se estudiaron solo aquellas ratas que desarrollaron ascitis tras 6-19 semanas. 57 % murieron durante la inducción. Ratras M S-D.
							• Bartoli R. et al, 2007 (152): ascitis 100 % tras 8-19 semanas (media 10, SD 1) y una mortalidad del 45 %. Ratras M S-D.
							• Ubeda M. et al, 2010 (153): 100 % desarrollaron cirrosis tras 12 semanas, pero no ascitis. Mortalidad 38 %. Ratras M Wistar

Tabla 6: Protocolos de inducción de cirrosis hepática mediante la administración orogástrica de CCl4 en ratas.

Referencia	Sexo/Cepa/ PC inicial (gr)	Inducción con fenobarbital	Intervalo de administración	Dosis de CCl4	Semanas de CCl4	Porcentaje de cirrosis y ascitis*	Mortalidad/Observaciones
Masuda et al, 1994 (157)	M/ S-D/ PC N.S. (4 semanas de edad)	0,05 % (PC/vol) de PHE 1 semana antes de CCl4 y posteriormente 10-14 días de PHE en el agua (35 mg/dl) antes y después de la administración CCl4	3 días a la semana	Dosis inicial y posteriores: 0,2 ml/kg diluído 1:1 en aceite de maíz	10-12	Desarrollo de cirrosis a partir de la semana 10- 12. Ascitis N.S.	Da información sobre la cinética de desarrollo de cirrosis. Sacrificaron a distintos tiempos: 2, 4, 6, 8, 10, y 12 semanas
Dupin S. et al, 1994 (127)	M/ S-D/ 60		2 veces por semana	Dosis inicial: 0,04 ml Dosis posteriores: ajustadas al PC el día de administración. Diluido en aceite	10	Desarrollo de cirrosis a partir de la semana 6, siendo todas las ratas cirróticas en la semana 10. Ascitis N.S.	Mortalidad < 30 %. Usaron tanto la ruta intraperitoneal como orogástrica, presentando la primera una mayor mortalidad y variabilidad en inducir cirrosis
Sogni P. et al, 1998 (158)	M/ S-D/ 300-380	No	3 días a la semana	Dosis inicial y posteriores: 1 mg/kg diluído 1:1 en aceite de maíz	10	N.S.	Mortalidad N.S. Hicieron estudios hemodinámicos. La presión portal media fue 12,1 mm Hg (SD 1.2). Otros estudios que han utilizado este protocolo: <ul style="list-style-type: none">Liu DG. et al, 2009 (147): 72 % desarrollaron fibrosis avanzada tras 10 semanas. Mortalidad del 28 %. Ascitis. N.S. Ratas M S-D
Wang Y-J. et al, 1998 (159)	M y H S-D: 250-400 Wistar: 150-200	No	Cada 5 días	Dosis inicial y posteriores: diluida en volumen igual de aceite de oliva S-D: - M: 1 ml/Kg - M/H: 1ml/Kg - H: 0,7 ml/kg	2 protocolo: - Corto: 3 - Largo: 6	Ascitis en protocolo largo: - M: 14,1 – 24,2 % - H: 16,9 – 21,6 % Información del protocolo corto N.S.	Mortalidad N.S. No mencionan diferencias en función de la especie, aunque el sexo sí influyó en la respuesta al CCl4 en las ratas S-D (mayor mortalidad en H, obligando a una reducción en la dosis de CCl4)
Desmyter L. et al, 2007 (128)	M/Wistar	No	2 veces por semana	Dosis inicial y posteriores: 5 mg/kg diluído en aceite de girasol	12	100 % desarrollaron cirrosis, pero no ascitis	Mortalidad N.S.
Fang H-L et al, 2007 (160)	M/Wistar/ 210-260	No	2 veces por semana	Dosis inicial y posteriores: 2 ml/Kg diluído 1:4 en aceite de oliva	9	3 ratas desarrollaron fibrosis moderada y 7 severa de acuerdo al método de Ruwart. 60% desarrollaron ascitis.	Mortalidad N.S. Otros estudios que han utilizado este protocolo: <ul style="list-style-type: none">Blanco Rivero et al, 2011 (161): 100 % desarrollaron cirrosis con un incremento ligero en la presión portal (8,42, SD 0,53), pero ninguna rata desarrolló ascitis
Regimbeau JM. et al, 2008 (129)	M/Fisher/ 150-180	2 semanas de PHE en el agua (0,5 gr/l) antes de la administración de CCl4 y posteriormente	2 regímenes: Protocolo corto: cada 4 días Protocolo largo: cada 6 días	Dosis inicial: 0,20 ml/Kg de CCl4 Dosis posteriores: ajustadas al PC el día de administración. Diluido en aceite de olive al 50%	Protocolo corto: 6 Protocolo largo: 9	Protocolo corto: cirrosis macroscópica en un 100 % y ascitis en un 60 % Protocolo largo: cirrosis macroscópica en un 100 % y ascitis en un 5 %	Protocolo corto: Mortalidad 30 % Protocolo largo: Mortalidad 10 %

* El porcentaje de desarrollo de ascitis y cirrosis se ha calculado excluyendo las ratas que fallecieron durante la inducción de cirrosis. En aquellos estudios en los que las ratas tratadas con CCl4 fueron divididas en grupos con diferentes tratamientos, estos porcentajes solo se calcularon para el grupo control o placebo. Abreviaturas: PC: peso corporal; PHE: fenobarbital; CCl4: tetracloruro de carbono; M: macho; H: hembra; S-D: cepa Sprague-Dawley; N.S.: no especificado; PBE: peritonitis bacteriana espontánea; Hg: mercurio; SD: desviación estándar

6.5. Métodos de anestesia en estudios experimentales

Si la selección del modelo animal constituye un paso crucial en la investigación con animales de laboratorio, la elección del régimen anestésico más adecuado es otro componente esencial del diseño experimental. La anestesia se define como un estado reversible inducido farmacológicamente, caracterizado por la ausencia de cualquier tipo de percepción sensorial, ya sea dolorosa o no. Puede ser general (animal inconsciente) o regional (sólo una parte del cuerpo no percibe estímulo sensorial alguno), y consta de varias fases (**Tabla 7**). Los componentes básicos de la anestesia general son cinco: hipnosis, analgesia, amnesia, relajación muscular, y bloqueo de la actividad refleja (**Tabla 7**) (162).

Su empleo no solo responde a cuestiones legales y éticas (principio de refinamiento), sino también a una necesidad metodológica. Permite realizar procedimientos quirúrgicos o dolorosos imposibles de realizar con el animal consciente, minimizando las consecuencias negativas de estos procedimientos sobre la fisiología del animal, sin dejar de proporcionar un trato humanitario a los animales. Adicionalmente, al reducir al máximo posible el dolor, sufrimiento y angustia padecidos por los animales de laboratorio, se consigue evitar respuestas nerviosas y endocrinas al estrés que pueden alterar la validez de los resultados (163, 164). Factores tales como la especie animal y cepa elegidas, sexo, edad, dieta, temperatura, momento del día del procedimiento, ruta de administración o el uso concomitante de otros fármacos pueden influir en la eficacia y toxicidad de cualquier anestésico (163). Los dos primeros son los más importantes, tal y como demuestra el hecho de que existen diferencias tan altas como del 300 % en la posología de algunos fármacos en función de la cepa de ratón utilizada (165). Por todo ello, han de tenerse en cuenta estos factores a la hora de elegir un régimen anestésico, pero también otros como la severidad del procedimiento (necesidad de un plano anestésico más profundo), duración del mismo (empleo de dosis repetidas de fármacos inyectables de duración corta o media, infusión continua de los mismos, o uso de fármacos de acción prolongada), seguridad para el animal y para el operador, y la experiencia y equipo disponible del personal investigador. Se ha de valorar también la potencial

Tabla 7: Fases de la anestesia y componentes de la anestesia general (162).**A. Fases de la Anestesia**

1. *Ayuno*: en determinadas especies no es necesario el ayuno, dado su bajo riesgo de broncoaspiración por vómitos durante el procedimiento (p.ej. roedores, cerdos y conejos).
2. *Premedicación*: administración de fármacos para relajar al animal y facilitar su manejo y reducir su ansiedad y miedo ante procedimientos que no está acostumbrado. En roedores no suele ser necesaria, pero sí ayuda en el cerdo.
3. *Inducción y mantenimiento anestésicos*: en esta fase el animal pasa al estado inconsciente y es mantenido en un nivel constante de profundidad anestésica.
4. *Reanimación*: el animal vuelve al estado consciente, pero sigue bajo los efectos residuales de la anestesia.
5. *Recuperación o postoperatorio*: una vez desaparecidos los efectos de la anestesia, el animal regresa progresivamente a su estado basal en función de la severidad del procedimiento realizado. Estas dos últimas fases están lógicamente ausentes en los procedimientos de no recuperación.

B. Componentes de la anestesia general:

1. *Hipnosis o sueño*: estado de inconsciencia del animal.
2. *Analgesia*: ausencia de percepción dolorosa.
3. *Amnesia*: pérdida del recuerdo de la experiencia quirúrgica.
4. *Relajación muscular*: la mayoría de los anestésicos proporcionan un grado de relajación moderado que permite realizar la mayor parte de los procedimientos quirúrgicos. Para una parálisis total es necesario la asociación de bloqueantes neuromusculares.
5. *Bloqueo de la actividad refleja*: favorece la estabilidad durante la anestesia al impedir respuestas del sistema nervioso autónomo (p.ej. alteraciones de la frecuencia cardíaca y tensión arterial).

interferencia de la anestesia con el objetivo de la investigación, evitando el uso de fármacos que puedan tener efectos sobre las variables a estudio. Así por ejemplo, el

halotano no debería utilizarse en estudios hemodinámicos hepáticos, ya que se ha demostrado que disminuye tanto la presión arterial media (PAM) como la presión portal (PP) (166).

En los últimos 30 años, la anestesia con ketamina intramuscular ha sido la utilizada en la mayor parte de los estudios realizados en ratas en el campo de la HTP (97, 104, 106, 123, 167, 168). Este fármaco es una arilciclohexidina que actúa fundamentalmente produciendo un antagonismo no competitivo del receptor N-metil-D-aspartato. Su inhibición tiene como consecuencia una variedad de efectos: amnésico, analgésico, hipnótico y cataléptico. Este último se caracteriza por estar el animal en un estado aparentemente consciente, pero indiferente a su entorno. Es la denominada anestesia disociativa, característica de este fármaco. Puede ser administrado también por vía intraperitoneal o intravenosa. Su uso como agente anestésico aislado tiene el inconveniente de asociar efectos secundarios frecuentes (p.ej. hipertonicidad muscular o incremento en la salivación), por lo que actualmente se combina con otros fármacos tales como la xilacina o el diazepam para prevenir su aparición y mejorar la profundidad de la anestesia (162, 169, 170). El diazepam es una benzodiacepina con efecto depresor sobre el sistema nervioso central, pero con mínimos efectos sobre el sistema cardiovascular en comparación con otros tranquilizantes (171). Posee efectos hipnóticos, ansiolíticos, amnésicos, miorelajantes y anticonvulsivos. Estos efectos son consecuencia de su unión al receptor del ácido γ -aminobutírico, provocando un cambio conformacional que aumenta su afinidad por este neurotransmisor inhibitorio (172). En los animales de laboratorio, a diferencia de lo que ocurre en la especie humana, el efecto sedante de las benzodiacepinas es relativamente bajo, por lo que se utilizan principalmente como coadyuvantes de otros anestésicos, como la citada Ketamina (162). El uso de esta combinación en ratas tiene una serie de inconvenientes importantes: i) la vía de administración intramuscular es engorrosa (cada fármaco se administra por separado) y dolorosa; ii) el volumen a inyectar está en el límite o por encima del recomendado para administración intramuscular (162, 173); iii) los niveles de los fármacos en sangre no son estables, ya que tienen un pico inicial y disminuyen con el tiempo; y iv) los fármacos tienen metabolismo hepático, por lo que su vida media y su efecto pueden diferir en ratas

normales comparado con ratas con cirrosis hepática y función hepática alterada (169, 174). En los últimos años, la anestesia inhalada está sustituyendo a la anestesia inyectada (175). Tiene la ventaja de ser más versátil al adaptarse a procedimientos de cualquier duración y permitir un mejor ajuste del nivel de anestesia. Su principal inconveniente es que requiere un equipamiento más complejo y costoso constituido por una máquina de anestesia que suministra un flujo de gas con un porcentaje conocido y regulable del anestésico, y un circuito que dirige este flujo al animal (162). Dos de los anestésicos volátiles más utilizados actualmente son el isoflurano y el sevoflurano, los cuales son mejor tolerados por el sistema cardiovascular que otros anestésicos de tipo halogenado más antiguos (halotano y enflurano). Ambos tienen un perfil anestésico muy similar, siendo su principal diferencia la menor duración de las fases de inducción y recuperación del sevoflurano (176).

A pesar de su importancia metodológica, son pocos los estudios originales que mencionan las potenciales interacciones del régimen anestésico en sus resultados o que hayan valorado el efecto de la anestesia en la hemodinámica sistémica o esplácnica, y en la distribución del flujo sanguíneo corporal (163). En ratas sin HTP, la escasa evidencia disponible procede de estudios del siglo pasado en los que se utilizaba la ketamina aislada u otros anestésicos hoy en desuso, tales como el halotano o el pentobarbital (167, 177-185) (Tabla 8). Son todavía más escasos los estudios en modelos animales de HTP, en los que los efectos del sevoflurano o de la combinación de Ketamina+Diazepam no han sido evaluados (114, 115, 166, 186-188) (Tabla 9). Los resultados de todos estos estudios ponen de manifiesto que la ketamina tiene escasos efectos sobre la PAM (la aumenta o no modifica) y que la adición de diazepam no parece modificar este efecto. El único estudio del que tenemos constancia que ha evaluado el efecto de la ketamina sobre la presión portal tanto en ratas cirróticas como normales no objetivó que ésta se modificara por dicho anestésico (187). Dadas las ventajas y el uso cada vez más extendido de la anestesia inhalada con sevoflurano, son necesarios nuevos estudios que valoren el efecto de este tipo de anestesia sobre la PAM, y muy especialmente sobre la presión portal.

INTRODUCCIÓN

Tabla 8: Influencia del régimen anestésico en la hemodinámica sistémica y en la distribución del flujo sanguíneo: Estudios en ratas sin hipertensión portal.

Ref.	Cepa/sexo/PC	Dosis anestésicos/ruta de administración	Objetivos	Resultados principales
Miller E.D. et al; 1980 (177)	Ratas M Wistar 230-400 gr	<ul style="list-style-type: none">• Ketamina 125 mg/kg i.m.• Halotano 1,3 %• Enflurano 2,2 %• Grupo control: ratas conscientes	<ul style="list-style-type: none">• Determinar la influencia del régimen anestésico en el GC y la distribución del flujo sanguíneo	<ul style="list-style-type: none">• Ketamina: descenso no significativo del GC. Mayor flujo al cerebro y menor al músculo. Descenso significativo de la PAM y FC (menor que los otros anestésicos). No efecto sobre la RPT.• Halotano: descenso significativo del GC. Mayor flujo al cerebro, riñón, hígado y colon, y menor al corazón y músculo. Descenso significativo en PAM y FC. No efecto sobre la RPT.• Enflurano: no cambios en el GC. Mayor flujo al pulmón, hígado, bazo y colon, y menor al corazón y músculo. Descenso significativo en PAM, FC, y RPT.
Idvall J; 1981 (178)	Ratas M Wistar 260-310 gr	<ul style="list-style-type: none">• Ketamina: bolo de 30 mg/kg iv seguido de una perfusión de 1,5 mg/kg/min• Pentobarbital: bolo de 30 mg/kg seguido de una perfusión con el 20 % de la dosis inicial por hora• Grupo control: ratas conscientes normo e hipovolémicas	<ul style="list-style-type: none">• Determinar la influencia del régimen anestésico en el GC y la distribución del flujo sanguíneo en ratas con hemorragia moderada o grave	<ul style="list-style-type: none">• Experimentos de hemorragia moderada: en comparación con ratas conscientes normo e hipovolémicas, el grupo de Ketamina tuvo un GC y PAM significativamente mayores. También presentó un mayor flujo al corazón, intestino delgado, riñones, y piel.• Experimentos de hemorragia grave: en comparación con ratas normo e hipovolémicas anestesiadas con pentobarbital, el grupo de Ketamina tuvo un GC y PAM significativamente mayores. También presentó un flujo mayor a la mayoría de órganos.
Seyde W.C. et al; 1984 (179)	Ratas M Sprague-Dawley 348 ± 4 gr	<ul style="list-style-type: none">• Halotano 1,2 %• Enflurano 2,2 %• Isoflurano 1,4 %• Ketamina: bolo de 125 mg/kg ip 30 min después 60 mg/kg ip. Posteriormente 1 mg/kg/min en infusión• Grupo control: ratas conscientes	<ul style="list-style-type: none">• Determinar la influencia del régimen anestésico en el GC y la distribución del flujo sanguíneo en ratas normo e hipovolémicas	<ul style="list-style-type: none">• Ratas Normovolémicas: valores de GC y FSHT similares en ratas conscientes y ratas anestesiadas con ketamina e isoflurano, y reducidos en los grupos de enflurano o halotano. Isoflurano no cambió el FHP o FHA, mientras que la Ketamina redujo el FHA e incrementó el FHP. La PAM fue más alta en el grupo de Ketamina que en ratas conscientes o con anestesia inhalada. Todos los anestésicos redujeron la FC, aunque la Ketamina en menor medida.• Ratas hipovolémicas (con hemorragia): el GC, PAM y FSHT fueron mayores en ratas conscientes o anestesiadas con isoflurano.
Wixson S.K. et al; 1987 (184)	Ratas M Sprague-Dawley PC N.S.	<ul style="list-style-type: none">• Pentobarbital: 30 - 40 mg/kg i.p.• Fentanilo-droperidol: 0,02- 0,04 ml/100 gr ip.• Ketamina + xilacina: 40 + 5; 60 + 7,5 mg/kg ip• Ketamina + diazepam: 40 + 5; 60 + 7,5 mg/kg ip	<ul style="list-style-type: none">• Comparar el efecto de diferentes dosis de 4 anestésicos sobre el sistema cardiovascular y respiratorio	<ul style="list-style-type: none">• De los 4 anestésicos investigados, la combinación de Ketamina+Diazepam fue la que menos afectó a la perfusión y ventilación, aunque a la dosis más elevada presentó la mortalidad más alta de todos los grupos (29 %)
Colombato L.A. et al; 1991 (167)	Ratas M Sprague-Dawley 280-300 gr	<ul style="list-style-type: none">• Ketamina 100 mg/kg im.• Control: Ratas conscientes	<ul style="list-style-type: none">• Evaluar los cambios en la circulación esplácnica durante los periodos de anestesia y postanestesia	<ul style="list-style-type: none">• La Ketamina no produjo cambios en el flujo de la arteria mesentérica superior

INTRODUCCIÓN

Tabla 8: Influencia del régimen anestésico en la hemodinámica sistémica y en la distribución del flujo sanguíneo: Estudios en ratas sin hipertensión portal.

Ref.	Cepa/sexo/PC	Dosis anestésicos/ruta de administración	Objetivos	Resultados principales
Conzen P.F. et al; 1992 (180)	Ratas M Sprague-Dawley	Sevoflurano 1,66 y 3,95 vol %	Comparar los efectos del isoflurano y sevoflurano en la hemodinámica sistémica y en la distribución del flujo sanguíneo	Las dosis de ambos anestésicos se ajustaron hasta inducir una PAM de 70 (dosis baja) y 50 mmHg (dosis alta) A la dosis baja ambos anestésicos tuvieron un efecto similar sobre la hemodinámica sistémica y regional A la dosis alta, en comparación con el sevoflurano, el isoflurano aumentó el flujo cerebral, gástrico, pancreático y muscular, además de mantener el GC.
		Isoflurano 0,96 y 2,43 vol%		
		Grupo control: ratas conscientes		
Araki M. et al; 1995 (181)	Ratas M Sprague-Dawley	Halotano 1,0 %	Comparar los efectos de diferentes anestésicos volátiles en la hemodinámica y metabolismo hepático en experimentos de perfusión hepática aislada	Todos los anestésicos disminuyeron el consumo hepático de oxígeno y aumentaron la producción de lactato, sin influir en el FSHT o consumo de glucosa Globalmente, el isoflurano fue el que presentó los efectos más favorables, sugiriendo los autores que en cirugías que limiten el aporte de oxígeno al hígado éste debe ser el anestésico a utilizar A concentraciones 1 CAM, isoflurano y sevoflurano tuvieron efectos similares en el consumo de oxígeno
		Enflurano 2,2 %		
		Isoflurano 1,5 %		
Grudmann U. et al; 1997 (182)	Female Lewis rats	Sevoflurano 2,2 %	Tras 15 minutos, se duplicaron las concentraciones de anestésicos	Halotano: en comparación con el grupo control y del isoflurano, disminuyó el flujo sinusoidal, en gran medida debido a una reducción del diámetro sinusoidal Isoflurano: en comparación con el grupo control, redujo el diámetro sinusoidal, pero lo compensó incrementando la velocidad de los hematíes Los autores concluyeron que el isoflurano fue el que menos afectó a la circulación sinusoidal, y el halotano el que más. El enflurano tuvo un efecto intermedio
		mg/kg ip y posterior dosis extra 25 mg/kg		
		Grupo control: pentobarbital, bolo de 50 mg/kg		
Sumitra M. et al; 2004 (185)	Ratas M Wistar	Tiopentato: 40 mg/kg i.p.	Elegir el régimen anestésico más adecuado para un modelo quirúrgico de ligadura de la arteria	La combinación de ketamina+Diazepam fue la que menos influyó en el sistema respiratorio y cardiovascular. Cada combinación de anestésicos se empleó en ratas normales, y en ratas sometidas a cirugía ficticia (sham) y ligadura de la arteria coronaria
		Ketamina + xilacina: 50 + 5 mg/kg i.p.		
		Ketamina + diazepam: 50 + 2,5 mg/kg i.p.		
Bahrami S. et al; 2011(183)	Ratas M Sprague-Dawley	Comparar el efecto de 3 regímenes anestésicos en la hemodinámica sistémica y en el daño orgánico en ratas normovolémicas y ratas sometidas a shock hemorrágico	Ratas con shock hemorrágico: la PAM y el índice cardiaco fue similar en todos los grupos. En comparación con el grupo de isoflurano, el daño orgánico fue mayor en los regímenes que utilizaron Ketamina	Ratas normovolémicas: la combinación Ketamina+Diazepam produjo un mayor incremento en la PAM, FC y RPT, pero también el mayor descenso en el índice cardiaco Ratas con shock hemorrágico: la PAM y el índice cardiaco fue similar en todos los grupos. En comparación con el grupo de isoflurano, el daño orgánico fue mayor en los regímenes que utilizaron Ketamina
		Ketamina + diazepam: 100 + 5 mg/kg im		
		Ketamina + xilacina: 100 + 4 mg/kg im		
	390-450 gr	Isoflurano: 1,8 %		

Tabla 9: Influencia del régimen anestésico en la hemodinámica sistémica y en la distribución del flujo sanguíneo: Estudios en ratas con hipertensión portal.

Ref.	Cepa/sexo/PC	Dosis anestésicos/ruta de administración	Objetivos	Resultados principales
Belghiti J. et al; 1981 (166)	Ratas M Sprague-Dawley	<ul style="list-style-type: none">Halotano: vol % N.S.Grupo control: ratas conscientes 200-250 gr	Determinar la influencia del halotano en el GC y PP en ratas normales y sometidas a LPVP	<ul style="list-style-type: none">En comparación con ratas conscientes normales y sometidas a LPVP, aquellas anestesiadas con halotano presentaron una PP, PAM y GC significativamente menoresTanta en ratas normales como sometidas a LPVP, la PP se midió de forma sucesiva en 4 situaciones: anestesiada, estado consciente, reanestesiada, y estado consciente
Lee S.S. et al; 1985 (188)	Ratas M Sprague-Dawley	<ul style="list-style-type: none">Pentobarbital sódico: 5 mg/100 mg PC ip PC N.S.	Determinar la influencia del pentobarbital en la hemodinámica y distribución del flujo sanguíneo en ratas sometidas a cirugía ficticia	<ul style="list-style-type: none">En ambos grupos (sham y LPVP) el pentobarbital produjo descensos significativos en el GC y FHA, e incrementó la RPTLa PP, FC y PAM no fueron influenciadas por el pentobarbital en ninguno de los dos grupos
Lee S.S. et al; 1986 (114)	Ratas M Sprague-Dawley	<ul style="list-style-type: none">Pentobarbital sódico: 5 mg/100 mg PC ip PC N.S.	Determinar la influencia del pentobarbital en la hemodinámica y distribución del flujo sanguíneo en ratas sometidas a cirugía ficticia (Sham) y LC	<ul style="list-style-type: none">En ambos grupos (sham y LC) el pentobarbital produjo un descenso significativo en el GC, e incrementó la RPT. En el grupo BDL, el pentobarbital causó también descensos en el FHP y FHA, y aumentó la FC y la resistencia portalLa PP y PAM no fueron influenciadas por el pentobarbital en ninguno de los dos gruposLos autores concluyeron que la anestesia con pentobarbital no es adecuada para estudios hemodinámicos
Debaene B. et al; 1990 (186)	Ratas M Sprague-Dawley	<ul style="list-style-type: none">Ketamina: bolo 30 mg/kg iv seguido de una perfusión iv a 1,5 mg/kg/minHalotano 1 %Enflurano 2,2 %Isoflurano 1,3%Grupo control: ratas cirróticas conscientes 308 ± 5 gr	Determinar la influencia de la anestesia en la hemodinámica sistémica y en el flujo sanguíneo esplácnico en ratas sometidas a LC en condiciones normo e hipovolémicas	<ul style="list-style-type: none">Condiciones de normovolemia: el índice cardíaco fue mayor en ratas conscientes y anestesiadas con isoflurano. No hubo diferencias en PAM, FHP o FC entre los grupos anestesiados. El flujo sanguíneo esplácnico fue menor con enflurano, y similar entre el resto de anestésicos, aunque el FHA fue menor en el grupo de ketamina en comparación con ratas conscientes y anestesiadas con isoflurano y halotanoCondiciones de hipovolemia: el índice cardíaco y FHP disminuyeron de forma similar en todos los grupos. En comparación con los grupos de enflurano y halotano, la PAM fue significativamente más elevada en los grupos de ketamina e isoflurano. El FHA fue similar en ratas conscientes y anestesiadas con isofluranoTodos los anestésicos tuvieron el mismo efecto sobre el FHP, pero actuaron de forma diferente sobre el FHALos autores concluyeron que el isoflurano fue el anestésico que de forma más eficiente mantenía la circulación esplácnica en ratas cirróticas sometidas a situaciones de hipovolemia. No midieron la PP

Tabla 9: Influencia del régimen anestésico en la hemodinámica sistémica y en la distribución del flujo sanguíneo: Estudios en ratas con hipertensión portal.

Ref.	Cepa/sexo/PC	Dosis anestésicos/ruta de administración	Objetivos	Resultados principales
Sikuler E., et al; 1991 (115)	Ratas M Sprague-Dawley 220-240 gr	<ul style="list-style-type: none">Ketamina 100-150 mg/kg imGrupo control: ratas conscientes sham y LC	Determinar la influencia de la ketamina en la hemodinámica y distribución del flujo sanguíneo en ratas sometidas a cirugía ficticia (sham) y LC	<ul style="list-style-type: none">Las ratas LC anestesiadas con ketamina presentaron una PAM significativamente mayor que ratas LC conscientes, sin existir diferencias en la FC, FHA, FHP o GC. En ratas sham la ketamina incrementó el FHP sin modificar la PAM, FC, GC o FHA. La PP no se midió en ratas conscientes por lo que no se pueden hacer comparaciones. La RPT fue menor en ratas conscientes en ambos grupos quirúrgicos
Van Roey G., et al; 1997 (187)	Ratas M Wistar 150 gr	<ul style="list-style-type: none">ÉterPentobarbital: 60 (ratas normales) y 30 mg/kg ip (ratas cirróticas)Ketamina: 150 (ratas normales) y 75 mg/kg ip (ratas cirróticas)Diazepam-fluanisona: 2,5 (ip) - 2 (im)(ratas normales); y 1 (ip) – 0,6 im mg/kg (ratas cirróticas)	<ul style="list-style-type: none">Determinar la influencia de la anestesia en la hemodinámica sistémica y esplácnica en ratas normales y cirróticas en condiciones normo e hipovolémicas	<ul style="list-style-type: none">Éter: dosis ajustada a la profundidad de la anestesia. Escasos efectos hemodinámicos, pero requirió una continua monitorización para evitar una depresión respiratoriaPentobarbital: produjo una supresión marcada del sistema nervioso simpático y una hipotensión profunda en ratas cirróticas. No influencia en la PPKetamina: las ratas presentaron una sensibilidad impredecible a la ketamina, especialmente las ratas cirróticas, con una mortalidad superior al 30 %. En ratas normovolémicas normales y cirróticas la ketamina no modificó la PAM o PP, pero disminuyó la FRDiazepam-fluanisona: produjo una profunda hipotensiónLa cirrosis se indujo mediante la administración de CCl4En las ratas conscientes, los estudios hemodinámicos se realizaron 3 horas después de anestesiarias con éter para la colocación de los catéteresLos autores concluyeron que los estudios hemodinámicos en ratas cirróticas deben realizarse preferentemente en estado consciente

Abreviaturas: Ref: referencia; PC: peso corporal; GC: gasto cardiaco; PAM: presión arterial media; PP: presión portal; FC: frecuencia cardiaca; FR: frecuencia respiratoria; N.S.: no especificado; LPVP: ligadura parcial de la porta; FHP: flujo hepático portal; FHA: flujo hepático arterial; RPT: Resistencia periférica total; ip: intraperitoneal; iv: intravenoso; im: intramuscular; LC: ligadura del colédoco; CCl4: tetracloruro de carbono.

7. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

7.1. Hipótesis

Estudios recientes clínicos y experimentales sugieren que las terapias anticoagulantes, principalmente las basadas en heparinas de bajo peso molecular (HBPM), podrían ser una importante herramienta terapéutica para prevenir y/o revertir el desarrollo de la fibrosis hepática y complicaciones asociadas a la enfermedad hepática avanzada. En la mayoría de estudios experimentales previos, sin embargo, el tratamiento anticoagulante se inició antes y/o en paralelo a la inducción de la cirrosis hepática, y su efecto beneficioso fue relativamente moderado y no completamente reproducible. Además, ninguno de los estudios examinó en detalle el efecto de la anticoagulación sobre la hipertensión portal y sobre la disfunción endotelial características de la cirrosis hepática.

La **HIPÓTESIS GENERAL** del presente trabajo es que la administración de enoxaparina, una HBPM, tiene efectos beneficiosos sobre la historia natural de la cirrosis hepática.

Las **HIPÓTESIS ESPECÍFICAS** que se evalúan en el presente trabajo son las siguientes:

1. La administración de enoxaparina reduce la progresión de la fibrosis hepática en ratas con cirrosis hepática inducida tanto por CCl₄ como por la ligadura del conducto biliar (LC), incluso cuando la enoxaparina es administrada en presencia de una cirrosis ya establecida.
2. La administración de enoxaparina atenúa la hipertensión portal y la disfunción endotelial características de la cirrosis hepática en ratas con cirrosis hepática inducida tanto por CCl₄ como por la ligadura del conducto biliar (LC).

7.2. Objetivos

El **OBJETIVO GENERAL** del presente trabajo fue **determinar los efectos de la administración crónica de enoxaparina sobre aspectos centrales de la historia natural de la cirrosis hepática, como el desarrollo de fibrosis hepática, de hipertensión portal y de sus complicaciones**. Para ello, evaluamos diversas dosis de enoxaparina y distintos modelos experimentales de cirrosis hepática: la rata con cirrosis hepática inducida por CCl₄ administrado por vía oral o por vía inhalada, y la rata con cirrosis hepática inducida por la ligadura del colédoco.

Dada la importancia de la reproducibilidad de los modelos experimentales para la identificación de potenciales efectos de la enoxaparina y la baja reproducibilidad del modelo de cirrosis hepática inducida por la administración de CCl₄ oral en ratas descrita en la literatura, nuestro proyecto incluyó dos estudios experimentales preliminares: uno dirigido a elegir el protocolo de cirrosis hepática inducida por CCl₄ oral que fuese más reproducible, y otro a elegir el régimen anestésico más óptimo para realizar la medición in vivo de la hemodinámica sistémica y hepática.

Así, los **OBJETIVOS ESPECÍFICOS** del presente trabajo fueron:

- I. **La optimización de aspectos del diseño experimental cruciales para la correcta evaluación de los efectos de la enoxaparina sobre la cirrosis hepática en ratas**, como son la reproducibilidad del modelo experimental de cirrosis hepática inducida por CCl₄ oral y la validación del régimen anestésico para las mediciones hemodinámicas in vivo. Para ello, nuestros objetivos fueron:

- A. **Comparar la reproducibilidad de dos protocolos de inducción de cirrosis hepática en ratas basados en la administración oral de CCl₄**. En concreto, comparar el protocolo tradicional desarrollado por Runyon *et al* (148) basado en la administración de CCl₄ una vez por semana con un protocolo ligeramente modificado del propuesto por Regimbeau *et al.* (129) de administración de CCl₄ dos veces por semana, en relación a:

- i. La mortalidad asociada.

- ii. La curva de ganancia de peso corporal.
- iii. Parámetros hematológicos, bioquímicos y de función hepática.
- iv. Parámetros cardio-respiratorios.
- v. El desarrollo de hipertensión portal y ascitis.
- vi. El desarrollo de fibrosis y cirrosis hepática.

B. Comparar los efectos de la anestesia con sevoflurano con los de la anestesia con Ketamina+Diazepam en ratas normales y en ratas con hipertensión portal inducida por la ligadura parcial de la vena porta. El modelo de ligadura parcial de la vena porta se utilizó en este objetivo por su facilidad, rapidez y reproducibilidad para producir hipertensión portal. Los parámetros que se evaluaron fueron:

- i. Parámetros anatómicos generales.
- ii. Estabilidad de la anestesia y necesidad de ajuste de dosis.
- iii. Mortalidad durante la anestesia.
- iv. Parámetros hematológicos, bioquímicos y gasométricos.
- v. Parámetros hemodinámicos sistémicos.
- vi. La medición de la presión portal.

II. Determinar los efectos de la enoxaparina, incluyendo la evaluación de distintas dosis, sobre la fibrosis hepática, la hipertensión portal y la disfunción endotelial, utilizando 3 modelos experimentales de cirrosis hepática. Así, nuestros objetivos fueron:

A. En ratas con cirrosis hepática inducida por la administración oral de CCl₄ y en ratas con cirrosis hepática inducida por la ligadura del colédoco (LC), evaluar el efecto de la enoxaparina sobre:

- i. La mortalidad.
- ii. La ganancia de peso corporal.
- iii. Parámetros hematológicos y bioquímicos.
- iv. El desarrollo de fibrosis hepática.

- v. Parámetros cardio-respiratorios.
- vi. El desarrollo de hipertensión portal y ascitis.
- vii. La translocación bacteriana y la respuesta inflamatoria sistémica.

B. En **ratas con cirrosis hepática inducida por la administración de CCl₄ inhalado**, determinar el efecto de la enoxaparina sobre la disfunción endotelial evaluada mediante estudios de perfusión portal aislado y bivascular hepática ex-vivo dirigidos a:

- i. Evaluar la modulación del tono vascular del lecho portal.
- ii. Evaluar la modulación del tono vascular de la arteria hepática.

8. MÉTODOS

8.1. Animales y diseños experimentales.

Todos los procedimientos con animales se realizaron de acuerdo a la Guía para el Cuidado y uso de Animales de Laboratorio (publicación NIH, revisada en 1996) (189) y en cumplimiento de la legislación de la Unión Europea (Directriz 2010/63/EU) y del Real Decreto RD53/2013 (98). La Comisión de Ética en Experimentación Animal de cada centro participante, en concreto del Instituto de Investigación Sanitaria Gregorio Marañón (IISGM) (Madrid, España), de la Universidad de Montreal (Montreal, QC, Canadá) y de la Universidad Martin-Lutero (Halle, Alemania), aprobó la realización de los experimentos correspondientes. En todos los casos, las ratas fueron estabuladas en jaulas convencionales y se mantuvieron a una temperatura y humedad constantes, con ciclos de 12 horas de luz-oscuridad.

Los animales y diseños experimentales utilizados en cada uno de los Objetivos planteados en el estudio son los siguientes:

a) Objetivo I.A: Comparación de dos protocolos de inducción de cirrosis hepática en ratas basados en la administración oral de CCl₄.

Treinta y ocho ratas Sprague-Dawley macho con un peso inicial de 130-200 gramos se estabularon en el animalario de IISGM, y tuvieron acceso libre a comida y agua a lo largo de todo el estudio. Desde una semana antes de la administración de CCl₄ y hasta la realización del estudio hemodinámico, se añadió fenobarbital al agua de bebida a una concentración de 35 gr/dL. Las ratas se dividieron aleatoriamente en tres grupos según el protocolo de administración de agua o CCl₄:

- Grupo control (**CTRL**, n=11), con administración de 0,5 mL de agua una vez por semana (los lunes).
- Grupo del protocolo de Runyon (**CCl₄-[1xSem]**, n=12), con administración orogástrica de CCl₄ una vez por semana (los lunes) según el protocolo descrito más adelante.
- Grupo del protocolo de Regimbeau modificado (**CCl₄-[2xSem]**, n=15), con administración de CCl₄ dos veces por semana (lunes y viernes) según el

protocolo correspondiente.

Tanto el agua como el CCl₄ ((Sigma-Aldrich-99,9% de pureza) se administraron por vía orogástrica a través de una cánula de metal. Cada dosis de CCl₄ se mezcló en agua a volúmenes iguales. No se requirió ayuno o anestesia para su administración. La administración de agua y CCl₄ se mantuvo durante 12 semanas o hasta el desarrollo de ascitis manifiesta a la exploración física o hasta la presencia de signos evidentes de malestar general. Entre dos y tres semanas tras la última dosis de CCl₄ o de agua, se realizó un estudio hemodinámico con medición directa de la presión portal. Tras el estudio hemodinámico, se obtuvieron muestras de sangre arterial y las ratas fueron sacrificadas posteriormente por exanguinación bajo anestesia profunda para la extracción y pesado de órganos y la toma de muestras de tejido.

b) Objetivo I.B: Comparación de los efectos de la anestesia con sevoflurano con los de la anestesia con Ketamina+Diazepam en ratas normales y en ratas con hipertensión portal inducida por la ligadura parcial de la vena porta (LPVP).

Cuarenta y una ratas Sprague-Dawley macho con un peso de 310-580 gramos se mantuvieron en el animalario de IISGM, y tuvieron acceso libre a comida y agua a lo largo de todo el estudio. Para comparar los efectos de los distintos regímenes anestésicos sobre las mediciones hemodinámicas, se realizó un estudio hemodinámico en los siguientes 4 grupos de ratas:

- Grupo **CTRL-Sevo** (n= 8): Ratas normales bajo anestesia con sevoflurano inhalado.
- Grupo **CTRL-KD** (n= 11): Ratas normales bajo anestesia con la combinación de Ketamina+Diazepam intramuscular.
- Grupo **LPVP-Sevo** (n= 9): Ratas con hipertensión portal inducida por LPVP bajo anestesia con sevoflurano inhalado.
- Grupo **LPVP-KD** (n= 13): Ratas con hipertensión portal inducida por LPVP bajo anestesia con la combinación de Ketamina+Diazepam intramuscular.

En las ratas con LPVP, los estudios hemodinámicos se realizaron el cuarto día tras la

cirugía, tiempo suficiente para que se establezca la circulación hiperdinámica sistémica y esplácnica característica de la hipertensión portal (103). La duración media de todos los procedimientos fue de 24 minutos. Tras el estudio hemodinámico, se obtuvieron muestras de sangre arterial y las ratas fueron sacrificadas posteriormente por exanguinación bajo anestesia profunda para la extracción y pesado de órganos y la toma de muestras de tejido.

c) Objetivo II.A: Evaluación de los efectos de la enoxaparina en ratas con cirrosis hepática inducida por la administración oral de CCl₄ y en ratas con cirrosis hepática inducida por la ligadura del colédoco (LC).

En estos experimentos también se utilizaron ratas Sprague-Dawley macho, pero se hicieron en 2 laboratorios diferentes: la evaluación de los efectos de la enoxaparina en ratas con cirrosis hepática inducida por la administración orogástrica de CCl₄ se realizaron en las instalaciones del IISGM (Madrid, España), mientras que la evaluación de sus efectos en ratas con cirrosis biliar inducida por LC se realizaron en colaboración con el Dr. C Rose en la Unidad de Investigación en Neurociencias de la Universidad de Montreal (Montreal, QC, Canadá). La **Figura 4** resume de forma esquemática los diseños experimentales utilizados en este estudio.

En los **experimentos dirigidos a evaluar los efectos de la enoxaparina en ratas con cirrosis hepática inducida por la administración de CCl₄ oral** se utilizó el protocolo de Regimbeau modificado. Se utilizaron dos dosis de enoxaparina: 40 UI/Kg sc ("*dosis baja*") y 180 UI/Kg sc ("*dosis alta*"). Tanto la enoxaparina como el placebo (suero salino) se administraron diariamente a partir de la octava semana de administración de CCl₄ y se mantuvieron hasta la realización del estudio hemodinámico. El CCl₄ se administró durante 12 semanas o hasta el desarrollo de ascitis o hasta observarse claros signos de malestar de las ratas. Como grupo control se utilizaron ratas pareadas por edad a las que se les administró 0,5 mL de agua una vez por semana. Así, se estudiaron los siguientes grupos de ratas:

- Grupo **Veh-Sal** (n= 5): Las ratas recibieron agua (Veh) en lugar de CCl₄ e inyecciones subcutáneas de suero salino (Sal, 0,5 mL/24h).

- Grupo **Veh-Enox40** (n= 5): Las ratas recibieron agua (Veh) en lugar de CCl₄ e inyecciones subcutáneas de enoxaparina a dosis bajas (Enox40, 40 UI/kg/24h).
- Grupo **Veh-Enox180** (n= 3): Las ratas recibieron agua (Veh) en lugar de CCl₄ e inyecciones subcutáneas de enoxaparina a dosis altas (Enox180, 180 UI/kg/24h).
- Grupo **CCl₄-Sal** (n= 12): Las ratas recibieron CCl₄ (CCl₄) en lugar de agua e inyecciones subcutáneas de suero salino (Sal, 0,5 mL/24h).
- Grupo **CCl₄-Enox40** (n= 13): Las ratas recibieron CCl₄ (CCl₄) en lugar de agua e inyecciones subcutáneas de enoxaparina a dosis bajas (Enox40, 40 UI/kg/24h).
- Grupo **CCl₄-Enox180** (n= 7): Las ratas recibieron CCl₄ (CCl₄) en lugar de agua e inyecciones subcutáneas de enoxaparina a dosis altas (Enox180, 180 UI/kg/24h).

Entre dos o tres semanas tras la última dosis de CCl₄ o de agua, se realizó un estudio hemodinámico con medición directa de la presión portal. Inmediatamente tras la apertura de la pared abdominal y en condiciones de esterilidad, se tomó una muestra de líquido ascítico para cultivo. Tras el estudio hemodinámico, se obtuvieron muestras de sangre arterial y las ratas fueron sacrificadas posteriormente por exanguinación bajo anestesia profunda para la extracción y pesado de órganos y la toma de muestras de tejido.

En los **experimentos dirigidos a evaluar los efectos de la enoxaparina en ratas con cirrosis biliar inducida por la LC**, sólo se evaluó la dosis alta de enoxaparina (180 UI/Kg/24h sc). Tanto la enoxaparina como el placebo (suero salino) se administraron diariamente a partir de la 2ª semana tras la realización de la LC o de la laparotomía simple (cirugía Sham) y se mantuvieron durante 4 semanas, momento en que se realizó el estudio hemodinámico, la toma de muestras sanguíneas y de líquido ascítico, y la toma de muestras de tejidos. Se estudiaron los siguientes 4 grupos de ratas:

- Grupo **Sham-Sal** (n= 6): Ratas con laparotomía simple tratadas con inyecciones subcutáneas de suero salino (Sal, 0,5 mL/24h).

- Grupo **Sham-Enox180** (n= 6): Ratas con laparotomía simple tratadas con inyecciones subcutáneas de enoxaparina a dosis altas (Enox180, 180 UI/kg/24h).
- Grupo **LC-Sal** (n= 10): Ratas con LC tratadas con inyecciones subcutáneas de suero salino (Sal, 0,5 mL/24h).
- Grupo **LC-Enox180** (n= 11): Ratas con LC tratadas con inyecciones subcutáneas de enoxaparina a dosis altas (Enox180, 180 UI/kg/24h).

Cinco semanas después de la realización de la cirugía Sham o de LC se realizó un estudio hemodinámico. Inmediatamente tras la apertura de la pared abdominal y en condiciones de asepsia, se tomó una muestra de líquido ascítico para cultivo. Tras el estudio hemodinámico, se obtuvieron muestras de sangre arterial y las ratas fueron sacrificadas posteriormente por exanguinación bajo anestesia profunda para la extracción y pesado de órganos y la toma de muestras de tejido.

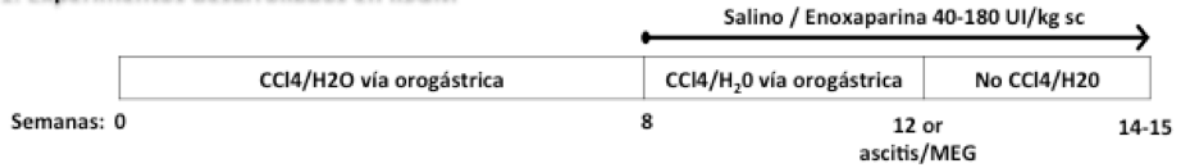
d) Objetivo II.B: Evaluación de los efectos de la enoxaparina sobre la disfunción endotelial evaluada en estudios de perfusión hepática bivascular ex-vivo en ratas con cirrosis hepática inducida por la administración de CCl₄ inhalado.

En estos experimentos se utilizaron 89 ratas Sprague-Dawley macho (peso inicial de 75-100 gramos), y se realizaron en colaboración con el Dr. A Zipprich en el Departamento de Medicina Interna de la Universidad de Martin Lutero (Halle-Wittenberg, Alemania). La cirrosis hepática se indujo en las ratas mediante la exposición a CCl₄ inhalado tres veces por semana, según el protocolo descrito más adelante. La **Figura 4** resume de forma esquemática los diseños experimentales utilizados en este estudio. Tanto la enoxaparina como el suero salino se administraron diariamente a partir de la 8ª semana de administración del CCl₄ y se mantuvieron hasta la realización de los estudios de perfusión portal aislada y bivascular ex-vivo, realizados en los siguientes grupos:

- Grupo **CCl₄-Sal** (n= 18): Ratas con cirrosis hepática inducida por CCl₄ inhalado que son tratadas con inyecciones subcutáneas de suero salino (Sal, 0,5 mL/24h).

- Grupo **CCl₄-Enox40** (n= 20): Ratas con cirrosis hepática inducida por CCl₄ inhalado que son tratadas con inyecciones subcutáneas de enoxaparina a dosis bajas (Enox40, 40 UI/kg/24h).

1. Experimentos desarrollados en IISGM

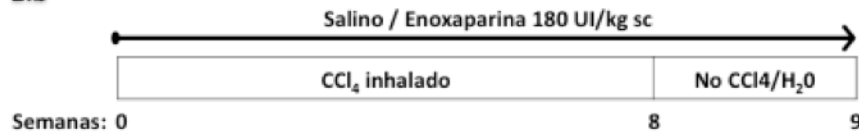


2. Experimentos desarrollados en el Departamento de Medicina Interna de la Universidad de Martín Lutero

2.a



2.b



3. Experimentos desarrollados en la Unidad de investigación en Neurociencias de la Universidad de Montreal

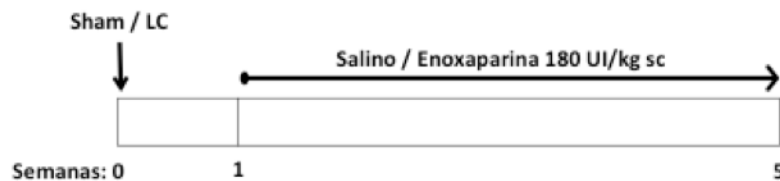


Figura 4. Diseños experimentales utilizados en los tres laboratorios, Cada uno utilizó un modelo diferente de cirrosis hepática. La dosis y tiempo de administración de la enoxaparina también varió. Abreviaturas: IISGM: Instituto de Investigación Sanitaria Gregorio Marañón; MEG: malestar general; CCl₄: tetracloruro de carbono; LC: ligadura del colédoco.

Debido a la posibilidad de que el efecto de la enoxaparina pudiese depender de la dosis o del momento de inicio de su administración en relación al estadio de la enfermedad hepática, realizamos experimentos adicionales en los que la enoxaparina se administró desde el inicio de la exposición al CCl₄ y durante 8 semanas. Así,

evaluamos los siguientes grupos adicionales:

- Grupo **CCl₄-Sal** (n= 22): Ratas con cirrosis hepática inducida por CCl₄ inhalado que son tratadas con inyecciones subcutáneas de suero salino (Sal, 0,5 mL/24h) desde el inicio de la exposición al CCl₄.
- Grupo **CCl₄-Enox180** (n= 29): Ratas con cirrosis hepática inducida por CCl₄ inhalado que son tratadas con inyecciones subcutáneas de enoxaparina a dosis altas (Enox180, 180 UI/kg/24h) desde el inicio de la exposición al CCl₄.

Entre 6 y 10 días tras la última dosis de CCl₄, se realizaron los estudios de perfusión hepática portal aislada y bivascular ex-vivo, según se describe más adelante.

8.2. Protocolos de inducción de cirrosis hepática por administración de CCl₄.

a) Protocolo de administración orogástrica de CCl₄ de Runyon.

La dosis inicial de CCl₄ fue de 0,02 mL. Las dosis posteriores se administraron con una periodicidad semanal (lunes) ajustadas al cambio de peso corporal a las 48 horas de la última dosis (**Tabla 10**) (148). A diferencia del protocolo original no se administró una dosis constante de 0,04 mL una vez que las ratas hubieron desarrollado ascitis. El peso corporal se midió antes de cada dosis y a los 2 y 4 días de la última administración de CCl₄ (lunes, miércoles y viernes). Las ratas del grupo control recibieron 0,5 mL de agua una vez por semana (los lunes) en lugar de CCl₄, y su peso corporal se midió antes de cada administración y 4 días después (los lunes y viernes).

b) Protocolo de administración orogástrica de CCl₄ de Regimbeau modificado.

Tanto la dosis inicial como las posteriores se basaron en el protocolo rápido desarrollado por Regimbeau *et al* (129). La dosis inicial de CCl₄ fue de 0,08 mL y las siguientes se administraron dos veces por semana (lunes y viernes), ajustándose al peso corporal medido antes de cada administración (**Tabla 10**). Las ratas del grupo control recibieron 0,5 mL de agua una vez por semana (los lunes) en lugar de CCl₄, y su

peso corporal se midió antes de cada administración y 4 días después (los lunes y viernes).

Tabla 10. Dosis de CCl₄ ajustadas a los cambios en el peso corporal en cada protocolo (129, 148)

<i>Cambio en el peso corporal a las 48 horas de la última dosis</i>	Protocolo de Runyon		Protocolo de Regimbeau modificado	
	<i>< 6 semanas de tratamiento</i>	<i>> 6 semanas de tratamiento</i>	<i>Peso corporal el día de la administración de CCl₄</i>	<i>Dosis de CCl₄</i>
<i>Estable o aumentando</i>	Aumentar dosis en 0,06 ml	Aumentar dosis en 0,08 ml	<i>150 - 230 gr</i>	0,20 ml/Kg
<i>Pérdida: 2 – 5,9 %</i>	Aumentar dosis en 0,04 ml	Aumentar dosis en 0,06 ml	<i>231 - 280 gr</i>	0,25 ml/Kg
<i>Pérdida: 6 - 10 %</i>	Aumentar dosis en 0,02 ml	Aumentar dosis en 0,04 ml	<i>281 – 310 gr</i>	0,30 ml/Kg
<i>Pérdida: 10,1 – 15 %</i>	Mantener dosis	Mantener dosis	<i>311 – 340 gr</i>	0,35 ml/Kg
<i>Pérdida: > 15 %</i>	Disminuir dosis en 0,04 ml	Disminuir dosis en 0,04 ml	<i>341 – 370 gr</i>	0,40 ml/Kg
			<i>371 – 390 gr</i>	0,45 ml/Kg

c) Protocolo de administración de CCl₄ inhalado.

La cirrosis hepática fue inducida mediante la exposición a CCl₄ inhalado tres veces por semana. Se añadió fenobarbital al agua de bebida a una concentración de 35 gr/dL. El protocolo fue el mismo que el utilizado por Loureiro-Silva *et al* (190). El CCl₄ se administró durante 8 ó 12-14 semanas en función de los diferentes grupos de experimentación.

8.3. Protocolos quirúrgicos de hipertensión portal pre-hepática y cirrosis biliar.

a) Protocolo quirúrgico de hipertensión portal pre-hepática: Ligadura parcial de la vena portal (LPVP).

La hipertensión portal pre-hepática se indujo mediante una LPVP según el método de Chojkier *et al* (191). Tras anestesiar a las ratas con sevoflurano inhalado (ver regímenes anestésicos), se realizó una laparotomía media. El omento y parte del intestino se desplazaron fuera de la cavidad abdominal y se cubrieron con una gasa humedecida en suero fisiológico. Tras disecar la vena porta en su vertiente proximal de la arteria hepática, se realizó una estenosis calibrada de la misma por medio de una ligadura (seda de 3-0) alrededor de un Abbocath de punta roma de 20G dispuesto en paralelo a la vena porta. Tras la ligadura se retiró el Abbocath, permitiendo la expansión de la vena porta hasta el calibre de 20-G. Seguidamente la laparotomía fue cerrada en dos planos con sutura continua y seda de 3-0, para finalmente aplicar una solución antiséptica (Povidona yodada) a la herida quirúrgica y administrar una dosis subcutánea (0,05 mg/kg) de buprenorfina (Buprenex, viales de 0,3 mg/mL, Reckitt Benckiser) para aliviar el dolor postoperatorio. La temperatura se controló durante todo el estudio a través de un termómetro rectal y se mantuvo estable ($37,5 \pm 0,5$ °C) mediante una almohadilla térmica. Todo el procedimiento quirúrgico se realizó en condiciones de asepsia.

b) Protocolo quirúrgico de inducción de cirrosis biliar: Ligadura del colédoco (LC).

La cirrosis biliar se indujo por medio de una LC en ratas macho Sprague-Dawley con un peso inicial de 250 gramos. Esta técnica se realizó bajo anestesia con sevoflurano inhalado de la manera siguiente (192): tras practicar una laparotomía media, el omento y parte del intestino se desplazaron fuera de la cavidad abdominal y se cubrieron con una gasa humedecida en suero fisiológico. Tras localizar el colédoco y disecarlo de la grasa subyacente, se inyectó en su interior formalina (1mL/mg) para impedir su dilatación. Posteriormente se realizó una doble ligadura con seda 3-0 y se resecó una porción del colédoco entre estas dos ligaduras. La laparotomía fue cerrada

en dos planos con sutura continua y seda de 3-0, para finalmente aplicar una solución antiséptica (Povidona yodada) a la herida quirúrgica. Las ratas del grupo control (Sham), se las sometió al mismo procedimiento, incluyendo una manipulación del colédoco, pero sin inyectar formalina o realizar ligadura ni sección del colédoco.

8.4. Anestesia.

En el presente trabajo utilizamos 2 tipos de regímenes anestésicos: la combinación de Ketamina+Diazepam intramuscular y la anestesia inhalada con sevoflurano. En ambos regímenes anestésicos, la profundidad de la anestesia se consideró suficiente cuando los animales no tenían reflejo pedal de retirada y no reaccionaban al corte de la piel o peritoneo. Posteriormente, su evaluación se realizó también por medio de parámetros cardio-respiratorios (frecuencia cardíaca y respiratoria, y PAM), y del reflejo pedal de retirada. Los protocolos anestésicos fueron los siguientes:

a) Combinación de Ketamina+Diazepam (KD).

Las ratas recibieron 75 mg/kg de Ketamina (Ketolar; viales de 50 mg/1 mL, Pzifer, Madrid, España) y 5 mg/kg de diazepam (Valium; viales de 5 mg/mL, Roche, Madrid, España) de forma separada a través de una inyección intramuscular en el margen antero-lateral de cada muslo. Los volúmenes de inyección correspondientes de cada anestésico oscilaron entre 0,50-0,87 mL y 0,33-0,58 mL, respectivamente. Se administraron dosis adicionales de ketamina (10 mg, 0,20 mL) según necesidad para mantener la profundidad de la anestesia. Las ratas en este protocolo no fueron suplementadas con oxígeno y respiraron aire ambiente.

b) Anestesia con sevoflurano inhalado.

El equipamiento consistió en un regulador de flujo para suministrar aire y oxígeno, un vaporizador para añadir sevoflurano (Laboratorios Abbott) al anterior flujo en una proporción conocida, y una cámara de inducción y mascarilla para la inducción y mantenimiento de la anestesia, respectivamente. Durante la fase de inducción, el flujo de aire y oxígeno fue de 5 L/min y la concentración de sevoflurano del 5%, mientras

que en la fase de mantenimiento se redujeron a 1 L/min y 2-3 %, respectivamente.

Cuando se requería ajustar la dosificación de la anestesia (dosis adicionales de ketamina, o reducción /aumento de la concentración de sevoflurano) durante la realización del estudio hemodinámico, la medición de presiones se reinició pasados 3 minutos de haber conseguido el plano anestésico adecuado.

8.5. Estudio hemodinámico.

Los estudios hemodinámicos se realizaron bajo un estricto control de la temperatura corporal a través de un termómetro rectal, manteniéndose estable ($37,5 \pm 0,5$ °C) mediante una almohadilla térmica. Una vez que las ratas fueron anestesiadas con sevoflurano o Ketamina+Diazepam, se canalizaron la arteria carótida común y la vena yugular externa derechas por medio de un catéter Abbocath de 24G (B. Braun) y un tubo de polietileno (PE50), respectivamente. De esta manera, se obtuvieron la presión venosa central y la PAM. Posteriormente, se realizó una laparotomía media y el omento y parte del intestino se desplazaron fuera de la cavidad abdominal y se cubrieron con una gasa humedecida en suero fisiológico. Tras localizar la vena ileocólica, ésta se canalizó a través de otro catéter Abbocath de 24G, permitiendo la medición de la presión portal. Tras 5 minutos de estabilización, se tomaron las presiones durante otros 5 minutos utilizando un registro multicanal (PowerLab, AD Instruments) y se analizaron con Lab Chart Reader (AD Instruments). Todo el experimento se realizó en condiciones de asepsia.

8.6. Perfusión hepática portal aislada y bi-vascular ex-vivo.

En estos experimentos, las ratas fueron anestesiadas con Ketamina (100 mg/kg; Ketaset, Fort Dodge Animal Health, Fort Dodge, IA, USA) y xilacina (40 mg por rata; Rompur Bayer, Alemania). Se realizaron tanto estudios de perfusión de la vena porta aislada como estudios bi-vasculares según se ha descrito previamente (132, 190):

a) Estudios de perfusión de la vena porta aislada.

Tras la apertura del abdomen, se colocaron unas ligaduras sueltas alrededor de la vena porta. Seguidamente se ligó la arteria hepática y se canularon el colédoco (para medir la producción de bilis durante el estudio) y la vena porta. Tras iniciar un sistema de perfusión (40 mL/min) con una solución oxigenada (gas carbónico, 95% O₂/5% CO₂) de Krebs-Henseleit con dextrosa (11 mM), se seccionó y canuló la vena cava (catéter de flujo de salida). Para poder medir la presión sinusoidal se enclavó un catéter PE50 en una vena suprahepática del lóbulo izquierdo. Después de la exanguinación hepática, todos los hígados fueron perfundidos con 100 mL de solución de Krebs-Henseleit en modo recirculación con un flujo constante de 40 mL/min. Las presiones de perfusión y sinusoidal se midieron de forma continua a través de dos transductores independientes (MLT 844, AD instruments, USA) conectados a la cánula de perfusión y catéter enclavado, respectivamente.

b) Estudios de perfusión bi-vascular.

En los estudios de perfusión biviales, tras la apertura del abdomen se colocaron ligaduras sueltas alrededor de la aorta (craneal a la salida del tronco celiaco), arteria mesentérica superior (inmediatamente distal a la salida de la aorta), y aorta (por debajo del origen de la arteria mesentérica superior). Las arterias gástrica izquierda y esplénica se ligaron en su origen y se colocó una ligadura suelta alrededor del esófago. Ambas arterias renales y la gastroduodenal también fueron ligadas. Se canularon el colédoco y vena porta por medio de un catéter PE10 y de teflón de 14 G, respectivamente. Se inició entonces una perfusión (30 mL/min) con una solución oxigenada (gas carbónico, 95% O₂/5% CO₂) de Krebs-Henseleit en un modo de no recirculación. Posteriormente se sacrificó al animal mediante una sección de la vena cava inferior, se canuló la aorta con catéter de teflón de 18G, y se cerraron las ligaduras alrededor de la arteria mesentérica superior y del esófago. Seguidamente se inició una perfusión de la arteria hepática (10 mL/min) con la anterior solución en modo de no recirculación y se cerraron el resto de ligaduras alrededor de la aorta. A continuación se canuló la vena cava con un catéter de teflón de 14 G y se abrió el

tórax. Para poder medir la presión sinusoidal se enclavó un catéter PE50 en una vena suprahepática del lóbulo izquierdo. El cierre de la ligadura alrededor de la cava inferior se cerró para asegurar el catéter enclavado, iniciándose en ese momento el periodo de estabilización. Durante este periodo y en el periodo experimental (medición de presiones), la presión de perfusión de la arteria hepática y vena porta se registraron de forma continua a través de dos transductores independientes (MLT 844, AD Instruments, USA). La presión suprahepática enclavada se midió con un tercer transductor durante el periodo experimental.

En ambos estudios, antes de cada procedimiento los sistemas de medida se calibraron con el punto 0 a nivel del hilio hepático, la solución de perfusión se oxigenó por medio de un pulmón artificial, y se mantuvo un flujo constante a través de una bomba peristáltica. La viabilidad del hígado se valoró mediante su aspecto macroscópico, la estabilidad de las curvas de perfusión y la cantidad de bilis producida durante la estabilización ($> 0,4 \mu\text{L}/\text{min}/\text{gr}$ de peso hepático). Tras los experimentos se extrajeron y pesaron el hígado y bazo. El análisis de las presiones de perfusión y sinusoidal se realizaron por medio de los programas PowerLab 8/35 y Chartv5.5.4 (AD Instruments, USA).

Diseño experimental de los estudios de perfusión.

Para investigar los efectos de la enoxaparina en la vena porta en los estudios de perfusión univascular se requiere una vasoconstricción previa del sistema venoso portal. Para ello, tras la estabilización se realizó una vasoconstricción con metoxamina (agonista α_1 ; 10^{-4} M; Sigma Chemicals Co.) seguida de una curva de dosis-respuesta utilizando cuatro dosis consecutivas de acetilcolina (vasodilatación dependiente del endotelio) (10^{-7} - 10^{-4} M Sigma Chemicals Co.), y S-Nitroso-N-Acetilpenicilamina (SNAP, vasodilatación independiente del endotelio) (10^{-7} - 10^{-4} M Sigma Chemicals Co.). Para investigar los efectos sobre la arteria hepática en los estudios de perfusión bivascuales, el sistema de perfusión se cambió a modo de circulación durante el periodo de estabilización en presencia o ausencia del inhibidor de la producción de óxido nítrico NG-monometil-L-arginina (L-NMMA) (10^{-4} M; Sigma Chemicals Co.). Tras

el periodo de estabilización, se interrumpió el flujo de salida del catéter enclavado en la vena suprahepática, permitiendo la medición de la presión enclavada. Finalmente, la perfusión se cambió a modo abierto en presencia o ausencia de L-NMMA y se realizaron curvas de dosis-respuesta utilizando varias dosis consecutivas de metoxamina (10^{-6} - 3×10^{-4} M, Sigma Chemicals Co).

Cálculo de las resistencias vasculares

La resistencia arterial hepática se calculó por medio del flujo arterial y presión de perfusión arterial hepáticas. La resistencia venosa portal se estimó a través de la presión de perfusión y flujo portales. La resistencia sinusoidal fue estimada por medio de la presión de enclavamiento y el flujo hepático total (suma de los flujos portal y de la arteria hepática).

8.7. Medición de parámetros hematológicos, bioquímicos y gasométricos.

Tras la toma de presiones, se extrajo una muestra arterial (3 mL) a través del catéter Abbocath insertado en la arteria carótida. El recuento hematológico se realizó en muestras recogidas en tubos EDTA. Para confirmar el recuento plaquetario se llevó a cabo un frotis sanguíneo por medio de la tinción de May-Grünwald (Merck Millipore). Se midieron también parámetros gasométricos, de coagulación y bioquímicos (perfil renal y hepático). Todas estas mediciones se realizaron por medio de un analizador automático.

8.8. Técnicas histológicas y cuantificación de la fibrosis hepática.

Una vez extraída la muestra de sangre, las ratas se sacrificaron por exanguinación seccionando la vena cava bajo anestesia profunda. Se extrajeron entonces el hígado y bazo para determinar su peso y se tomó una muestra del lóbulo lateral izquierdo del hígado, la cual se fijó en una solución de formalina al 10 %. Los cortes histológicos se tiñeron con rojo Sirio (Direct Red 80, Sigma-Aldrich) y tricrómico de Masson (Bio-

Optica Milano SpA) para evaluar la fibrosis. Su medición se realizó de forma semicuantitativa a través de la escala de Ishak (193) y cuantitativamente por medio del software Image J en 30 (magnificación 20x en la tinción de tricrómico de Masson) y 15 (magnificación 10x en la tinción de rojo Sirio) campos oculares por corte histológico. Se estableció un filtro RGB (rojo, verde, azul) para detectar las áreas teñidas de colágeno, las cuales se cuantificaron como un área en píxeles y el resultado se expresó como porcentaje. Todo el análisis histológico se realizó de forma ciega para el investigador.

8.9. Cultivo de líquido ascítico.

Inmediatamente tras abrir el abdomen, se tomó una alícuota de líquido ascítico en caso de estar presente. La alícuota se depositó en tubos con tioglicolato medio fluido y se incubaron durante 48 horas a 37 °C. Después de ese tiempo, se valoró la existencia de crecimiento bacteriano, considerándose positivos aquellos con presencia de turbidez en los tubos en comparación con un control al que no se le alicuotó muestra.

8.10. Medición de niveles circulantes de IL-6.

Los niveles circulantes de IL-6 se midieron en una muestra de sangre arterial obtenida al final de los estudios hemodinámicos y antes del sacrificio. Para ello, la muestra de sangre se depositó en tubos conteniendo heparina que se centrifugaron a 10.000 rpm a 4°C. Los niveles de IL-6 se midieron en el plasma sobrenadante mediante ELISA, utilizando el kit Rat IL-6 ELISA Set (BD OptEIA, BD Biosciences) siguiendo las instrucciones del fabricante.

8.11. Análisis de expresión de genes pro-fibrogénicos en tejido hepático.

Para tratar de detectar con mayor sensibilidad posibles efectos de la enoxaparina sobre la fibrosis, evaluamos la expresión de mRNA en tejido hepático de tres genes involucrados en la fibrogénesis hepática: *Colagen-1 alpha (Col1a1)*, *Tissue inhibitor of*

metalloproteinase-1 (Timp1) y *Alpha-smooth muscle actin (Acta2)*. Para ello, extraímos RNA total de 30 mg de tejido hepático utilizando Trizol (Invitrogen) y un homogeneizador de tejidos (LT Tissue Lyser, Qiagen), según las instrucciones del fabricante. Un microgramo de RNA fue transcrito a cDNA utilizando el kit iScript de Bio-Rad. La RT-PCR en tiempo real fue realizada en un termociclador iQ5 (Bio-Rad) usando el Taqman Universal Master Mix II with UNG (ABI, Life Sciences) y sondas Taqman para los genes *Col1a1* (Rn01463848_m1), *Timp1* (Rn01430873_g1) y *Acta2* (Rn01759928_g1). Los resultados fueron analizados utilizando el método Delta-Delta CT y la expresión del RNAm de beta-actina (*Atcb*) para la normalización.

8.12. Análisis estadístico.

Las variables cuantitativas se expresaron como porcentaje \pm SD, o mediana (rango), mientras que las variables cualitativas se expresaron como porcentaje. Las diferencias entre grupos en las variables continuas se estudiaron mediante el análisis de la varianza (ANOVA) o la correspondiente prueba no paramétrica de Kruskal Wallis, mientras que en las variables categóricas se utilizó el test exacto de Fisher. Se estableció como nivel de significación estadística un valor de p inferior a 0,05. Las comparaciones múltiples *post-Hoc* se realizaron con el test de Tukey o Dunn. En los estudios de perfusión, las comparaciones entre medidas repetidas se realizaron por medio de ANOVA con medidas repetidas seguida del test de Bonferroni para detectar diferencias entre grupos. El programa estadístico utilizado fue el GraphPad Prism versión 6.00 para Machintosh (GraphPad Software, San Diego California USA, www.graphpad.com).

9. RESULTADOS

9.1. OBJETIVO I: OPTIMIZACIÓN DE ASPECTOS DEL DISEÑO EXPERIMENTAL CRUCIALES PARA LA EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS DE LA ENOXAPARINA SOBRE LA CIRROSIS HEPÁTICA EN RATAS.

9.1.1. Objetivo I.A: Comparación de dos protocolos de inducción de cirrosis hepática en ratas basados en la administración oral de CCl₄.

En el **Objetivo I.A**, comparamos 2 protocolos para desarrollar cirrosis hepática inducida por la administración oral de CCl₄ en ratas: por un lado, el protocolo de Runyon basado en la **administración oral de CCl₄ una vez por semana** (grupo **CCl₄-[1xSem]**), y por otro un protocolo modificado basado en el desarrollado por Regimbeau consistente en la **administración oral de CCl₄ dos veces por semana** (grupo **CCl₄-[2xSem]**).

Mortalidad

Todas las ratas del grupo control (**CTRL**) sobrevivieron hasta el final de los experimentos. Como era esperable, los grupos tratados con CCl₄ presentaron una mortalidad moderada, pero fue similar en el grupo **CCl₄-[1xSem]** y el **CCl₄-[2xSem]**: 17% vs. 33%, $p=0,41$. En el grupo **CCl₄-[1xSem]** fallecieron dos ratas, ambas en la semana 13 (tras finalizar la administración de CCl₄). En el grupo **CCl₄-[2xSem]** fallecieron 5 ratas, 3 de ellas debido a un fallo de administración del CCl₄ (inyección accidental en el tracto respiratorio) y las otras 2 a lo largo de la inducción de la cirrosis hepática (semanas 2 y 10). Por tanto, al final del estudio hubo un total de 11 de ratas en el grupo CTRL y de 10 ratas en cada grupo tratado con CCl₄.

Ganancia de peso corporal

La **Figura 5** muestra la evolución del peso corporal en los distintos grupos a lo largo de todo el estudio. El peso corporal fue similar en los tres grupos al comienzo del tratamiento con CCl₄ o vehículo (**CTRL**: 310 ± 63 gr vs. **CCl₄-[1xSem]**: 274 ± 25 gr vs. **CCl₄-**

[2xSem]: 277 ± 27 gr, $p=0,54$). Comparada con la del grupo **CTRL**, la ganancia de peso corporal tendió a ser más lenta en los grupos **CCl4-[1xSem]** y **CCl4-[2xSem]**, pero al final del estudio no hubo diferencias significativas en el peso corporal entre los tres grupos (543 ± 80 gr vs. 479 ± 47 gr vs. 471 ± 69 gr, $p=0,11$).

La apariencia de la curva de ganancia de peso, sin embargo, sí mostró diferencias llamativas entre los distintos grupos. En el grupo **CCl4-[1xSem]**, las ratas sufrieron una considerable pérdida de peso corporal tras cada dosis de CCl4 seguida de una mayor ganancia entre cada toma, adoptando un claro trazado en dientes de sierra. En el grupo **CCl4-[2xSem]**, sin embargo, la curva de ganancia de peso no tuvo dientes de sierra y fue más suave y regular al igual que la del grupo **CTRL** (**Figura 5**). La dosis total de CCl4 fue similar entre los grupos **CCl4-[1xSem]** y **CCl4-[2xSem]**: $3,5 \pm 0,64$ mL vs. $3,1 \pm 0,76$ mL, $p=0,16$.

Parámetros hematológicos, bioquímicos y de función hepática

La **Tabla 11** muestra los resultados hematológicos y bioquímicos de cada grupo. Mientras que los grupos **CTRL** y **CCl4-[1xSem]** mostraron (salvo por alguna alteración de la fórmula leucocitaria) valores hematológicos, bioquímicos y gasométricos similares, el grupo **CCl4-[2xSem]** mostró un claro empeoramiento de la función hepática con niveles más altos de bilirrubina ($p<0,05$), AST ($p<0,01$), ALT ($p<0,01$), y de INR ($p<0,001$), y con valores más bajos de fibrinógeno ($p<0,01$) y albúmina ($p<0,0001$). No se objetivaron diferencias en parámetros de función renal, iones o en el equilibrio ácido-base entre ninguno de los grupos.

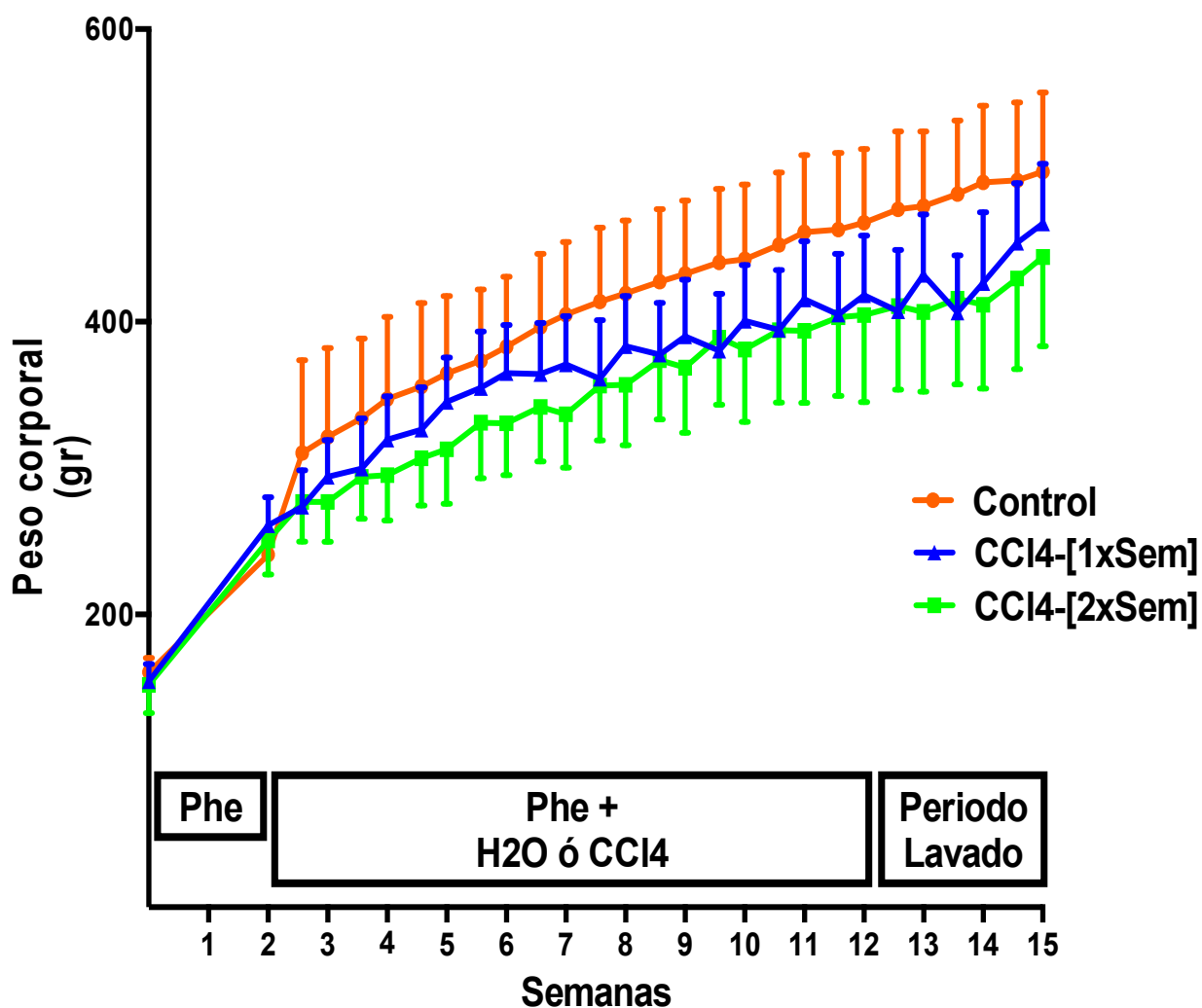


Figura 5: Evolución de la ganancia de peso corporal en ratas del grupo control (CTRL-línea naranja, H₂O una vez por semana) y en grupos de ratas que siguen el protocolo de administración de CCl₄ de una vez por semana (CCl₄-[1xSem], línea azul) y de dos veces por semana (CCl₄-[2xSem], línea verde). La gráfica muestra el peso corporal (media y desviación estándar de cada grupo a distintos tiempos).

Abreviaturas: Phe: fenobarbital; H₂O: agua; CCl₄: tetracloruro de carbono.

Tabla 11. Parámetros hematológicos, bioquímicos y de función hepática.

	CTRL (n=11)	CCl ₄ -[1xSem] (n=10) ^a	CCl ₄ -[2xSem] (n=10) ^a
Hematíes (10x6/ μ L)	7,6 \pm 0,5	7,6 \pm 0,3	7,0 \pm 0,7 ^θ
Hemoglobina (gr/dl)	14,1 \pm 0,6	13,7 \pm 0,6	13,2 \pm 0,8 *
Hematocrito (%)	40,5 \pm 2,5	39,7 \pm 1,4	39,5 \pm 1,9
Volumen corpuscular medio (fL)	53,3 \pm 2,0	52,4 \pm 1,8	56,9 \pm 4,1 ^θ
Leucocitos (10x3/ μ L)	1,5 (0,7-9)	1,1 (0,7-2,9)	7,2 (1,2-20,8) ^θ
Fórmula (%)			
• Polimorfonuclear	1,8 (0,7-32)	7,6 (4,7-21,4) ^δ	2,5 (0,6-5,6)
• Linfocitos	89,7 (66,8-97,6)	70,0 (50,9-80,7) ^ξ	95,3 (77,7-98,6)
• Monocitos	0,1 (0-2,9)	15,1 (8,9-36,1) ^ξ	1,3 (0,1-17,9)
• Eosinófilos	0,7 (0-1,7)	0,4 (0-0,9)	0,3 (0-2,1)
• Basófilos	0,2 (0-21,9)	0,5 (0,1-1,1)	0,2 (0-7,3)
Plaquetas (10x3/ μ L)	905 \pm 93	865 \pm 97	542 \pm 246 ^{θθθ}
Tiempo protrombina (segundos)	11,5 \pm 1,3	11,6 \pm 0,4	15,3 \pm 2,2 ^{θθθθ}
INR	1,1 \pm 0,1	1,1 \pm 0,0	1,4 \pm 0,2 ^{θθθ}
Fibrinógeno (mg/dL)	225 \pm 36	235 \pm 25	152 \pm 56 ^{θθ}
Glucosa (mg/dL)	220 \pm 74	174 \pm 30	130 \pm 34 ^{**}
ALT (U/L)	32 \pm 12	45 \pm 17	75 \pm 20 ^{θθ}
AST (U/L)	54 (47-105)	67 (40-185)	210 (127-311) ^{θθ}
Bilirrubina total (mg/dL)	0,1 (0-0,1)	0,1 (0,1-0,4)	0,45 (0,1-1,7) ^θ
FA (U/L)	66 \pm 10	123 \pm 25	221 \pm 105 ^{θθ}
Albúmina (g/dL)	3,5 \pm 0,3	3,2 \pm 0,3	2,5 \pm 0,4 ^{θθθθ}
Proteínas totales (g/dL)	5,3 (5,2-5,5)	5,3 (4,9-5,6)	4,5 (3,4-4,6) ^{θθ}
LDH (U/L)	138 (92-291)	155 (80-253)	207 (191-542) [^]
Creatinina (mg/dL)	0,34 (0,24-0,4)	0,28 (0,2-0,4)	0,20 (0,2-0,56)
Urea (mg/dL)	28 \pm 6	28 \pm 5	22 \pm 4
Na (mmol/L)	138 \pm 2	140 \pm 2	140 \pm 2
K (mmol/L)	5,2 \pm 0,7	5,3 \pm 0,4	5,6 \pm 0,5
pH	7,39 \pm 0,08	7,45 \pm 0,04	7,38 \pm 0,06
pCO ₂ (mm Hg)	46 \pm 7	39 \pm 4	40 \pm 7
pO ₂ (mm Hg)	400 \pm 131	456 \pm 20	395 \pm 51
HCO ₃ (mmol/L)	28 \pm 1,0	27 \pm 0,7	29 \pm 1,4
Lactato (mmol/L)	0,9 \pm 0,3	0,9 \pm 0,3	0,9 \pm 0,2

Los valores se expresan como media \pm SD o mediana (rango).

^a Los análisis de 1 rata del grupo CCl₄-[1xSem] y de 2 ratas del CCl₄-[2xSem] no se pudieron realizar.

^δ p < 0,05 comparado con CCl₄-[2xSem].

^ξ p < 0,05 comparado con CTRL y CCl₄-[2xSem].

[^] p < 0,05 comparado con CCl₄-[1xSem].

^θ p < 0,05; ^{θθ} p < 0,01; ^{θθθ} p < 0,001; ^{θθθθ} p < 0,0001 comparado con CTRL y CCl₄-[1xSem].

* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001 comparado con CTRL.

Abreviaturas: ALT: alanina aminotransferasa, AST: aspartato aminotransferasa, FA: fosfatasa alcalina, HCO₃: bicarbonato, INR: international normalized ratio, K: potasio, LDH: lactato deshidrogenasa, Na: sodio, pO₂: presión parcial de oxígeno, pCO₂: presión parcial de dióxido de carbono.

Parámetros cardío-respiratorios

La administración de CCl₄ por los dos protocolos no indujo grandes cambios en parámetros hemodinámicos sistémicos, excepto por una presión arterial media más elevada en el grupo **CCl₄-[1xSem]** comparada con la de los grupos **CCl₄-[2xSem]** y **CTRL** ($p < 0,05$, **Tabla 12**). Los valores de la frecuencia cardíaca, de la presión venosa central, y también de la frecuencia respiratoria, fueron similares en los tres grupos (**Tabla 12**).

Tabla 12. Parámetros hemodinámicos sistémicos y frecuencia respiratoria

	CTRL (n=11)	CCl₄-[1xSem] (n=10)^a	CCl₄-[2xSem] (n=10)^a
<i>FC (latidos/min)</i>	334,7 ± 33,1	319,6 ± 29,6	305,6 ± 31,380 [#]
<i>PAM (mm Hg)</i>	97,9 ± 15,1	111,6 ± 9,4 *	88,53 ± 8,756
<i>PVC (mm Hg)</i>	2,4 ± 1,4	2,1 ± 1,1	2,4 ± 1,7
<i>FR (respiraciones/min)</i>	50,4 ± 5,2	56,4 ± 3,6	50,9 ± 7,0

Los valores se expresan como media ± SD.

* $p < 0,05$ comparado con los Gp-C y Gp-N; [#] $p < 0,01$ comparado con los Gp-C y Gp-R.

^a El estudio hemodinámico no se pudo realizar en 1 rata del grupo **CCl₄-[1xSem]** y en 3 ratas del **CCl₄-[2xSem]** debido a fallos técnicos.

Abreviaturas: FC: frecuencia cardíaca, PAM: presión arterial media, PVC: presión venosa central, FR: frecuencia respiratoria.

Desarrollo de hipertensión portal y ascitis

La inducción de hipertensión portal se valoró tanto por la medición directa de la presión portal como por indicadores indirectos como el desarrollo de esplenomegalia, de trombopenia y de ascitis.

Si bien el grupo **CCl₄-[1xSem]** presentó una elevación de la presión portal respecto al grupo control (**CTRL**: 6,8±1,5 mmHg vs. **CCl₄-[1xSem]**: 9,9±2,2 mmHg, $p < 0,01$), el desarrollo de hipertensión portal fue significativamente mayor en el grupo **CCl₄-[2xSem]** (14,5±2,7 mmHg, $p < 0,001$ respecto al resto, **Figura 6.A**). Los dos grupos que recibieron CCl₄ desarrollaron esplenomegalia, evaluada por la relación “peso del bazo/peso corporal” (**CTRL**: 0,16±0,02 gr vs. **CCl₄-[1xSem]**: 0,26±0,11 gr vs. **CCl₄-[2xSem]**: 0,40±0,09 gr), pero la esplenomegalia fue mayor en el grupo **CCl₄-[2xSem]**

que en el grupo **CCl4-[1xSem]** ($p<0,01$, **Figura 6.B**). Respecto al desarrollo de trombopenia, sólo el grupo **CCl4-[2xSem]** presentó una disminución significativa del número de plaquetas circulantes ($p<0,0001$ vs. **CTRL**, $p<0,001$ vs. **CCl4-[1xSem]**, **Figura 6.C**).

La incidencia de ascitis fue del 0% en el grupo **CTRL**, del 10% en el grupo **CCl4-[1xSem]**, y del 80% en el grupo **CCl4-[2xSem]** ($p<0,01$ **CCl4-[2xSem]** vs. el resto). Mientras que ninguna de las ratas del grupo **CCl4-[1xSem]** desarrolló ascitis antes de la semana 12, dos ratas del grupo **CCl4-[2xSem]** desarrollaron ascitis precozmente en las semanas 8 y 11 que obligó a finalizar la administración de CCl4.

Desarrollo de fibrosis y cirrosis hepática

Todas las ratas tratadas con CCl4, tanto del grupo **CCl4-[1xSem]** como del **CCl4-[2xSem]**, desarrollaron fibrosis y claros criterios de cirrosis hepática según la escala de Ishak evaluada en secciones de tejido hepático teñidas con Hematoxilina-Eosina (**Figuras 7 y 8**). El área de fibrosis (%) fue cuantificada de forma más precisa en secciones teñidas con rojo Sirio (**Figura 9.A**) y con el tricrómico de Masson (**Figura 9.B**). El área de fibrosis medida con ambas tinciones fue mayor en los grupos **CCl4-[1xSem]** ($p<0,01$) y **CCl4-[2xSem]** ($p<0,001$) comparado con el grupo **CTRL** (**Figura 9.A y 9.B**). Notablemente, el área de fibrosis en el grupo **CCl4-[2xSem]** fue mayor que en el **CCl4-[1xSem]** ($p<0,001$).

La masa hepática fue normal en los grupos **CTRL** y **CCl4-[1xSem]**, pero el grupo **CCl4-[2xSem]** desarrolló una importante atrofia del hígado, evaluada por la relación “peso hígado/peso corporal”: $3,48\pm0,36$ gr vs. $3,58\pm0,55$ gr vs. $2,38\pm0,89$ gr, $p<0,01$ **CCl4-[2xSem]** vs. el resto, **Figura 9.C**).

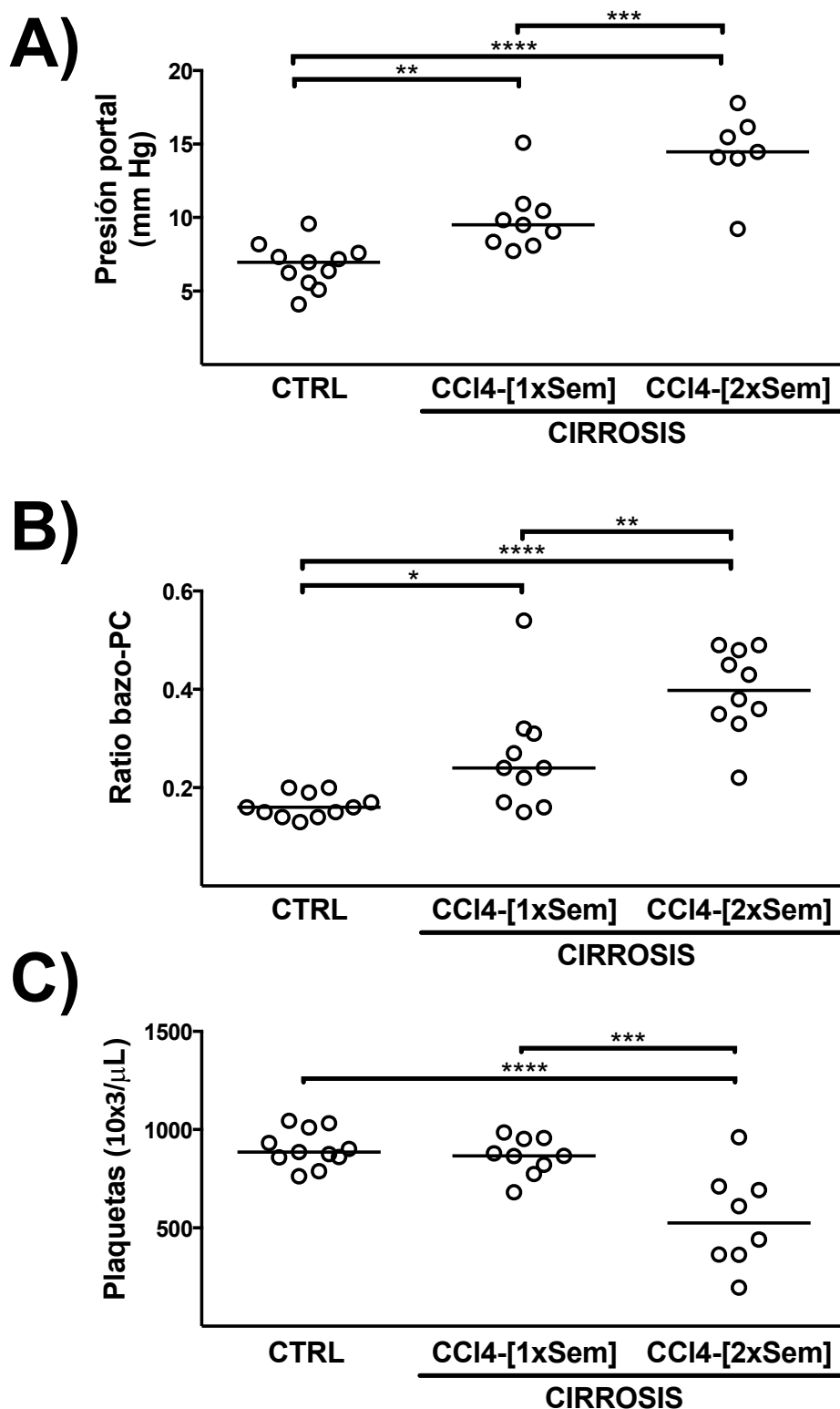


Figura 6: Desarrollo de hipertensión portal (A), esplenomegalia (B), y trombopenia (C) en ratas del grupo control (CTRL, H₂O una vez por semana) y en grupos de ratas que siguen el protocolo de administración de CCl₄ de una vez por semana (CCI₄-[1xSem]) y de dos veces por semana (CCI₄-[2xSem]). Cada símbolo representa los valores individuales de cada rata y la línea horizontal la mediana de cada grupo.

* = p<0,05; ** = p<0,01; *** = p<0,001; **** = p<0,0001.

Abreviaturas: H₂O: agua; CCl₄: tetracloruro de carbono.

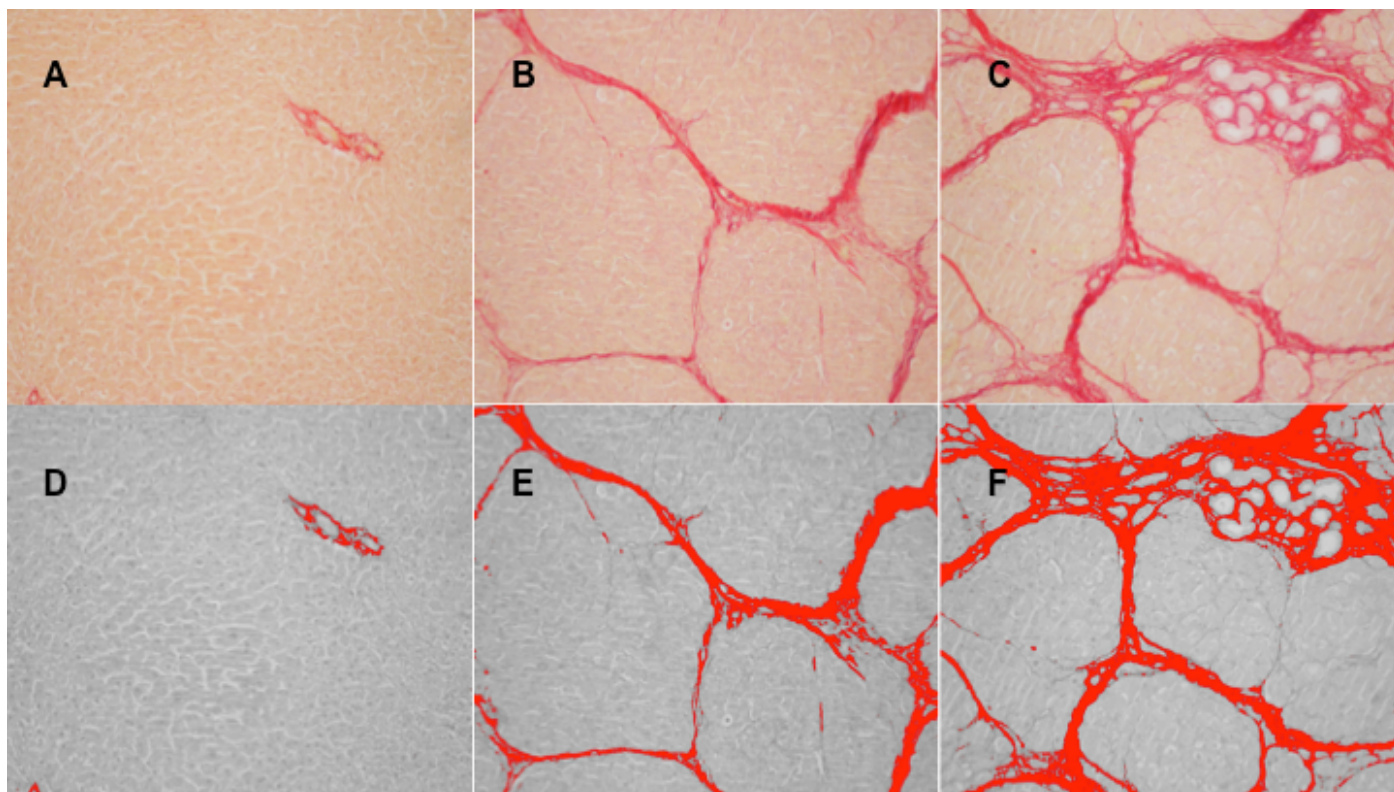


Figura 7. Secciones hepáticas teñidas con rojo Sirio para evaluar la fibrosis en ratas del grupo control (H₂O una vez por semana)(A) y en grupos de ratas que siguen el protocolo de administración de CCl₄ de una vez por semana (B) y de dos veces por semana (C) con sus correspondientes imágenes RGB (D a F) (10x). A: hígado del grupo control con preservación de arquitectura hepática; B: Cirrosis hepática establecida con nódulos separados por tabiques fibrosos; C: Cirrosis hepática establecida con mayor grado de fibrosis.

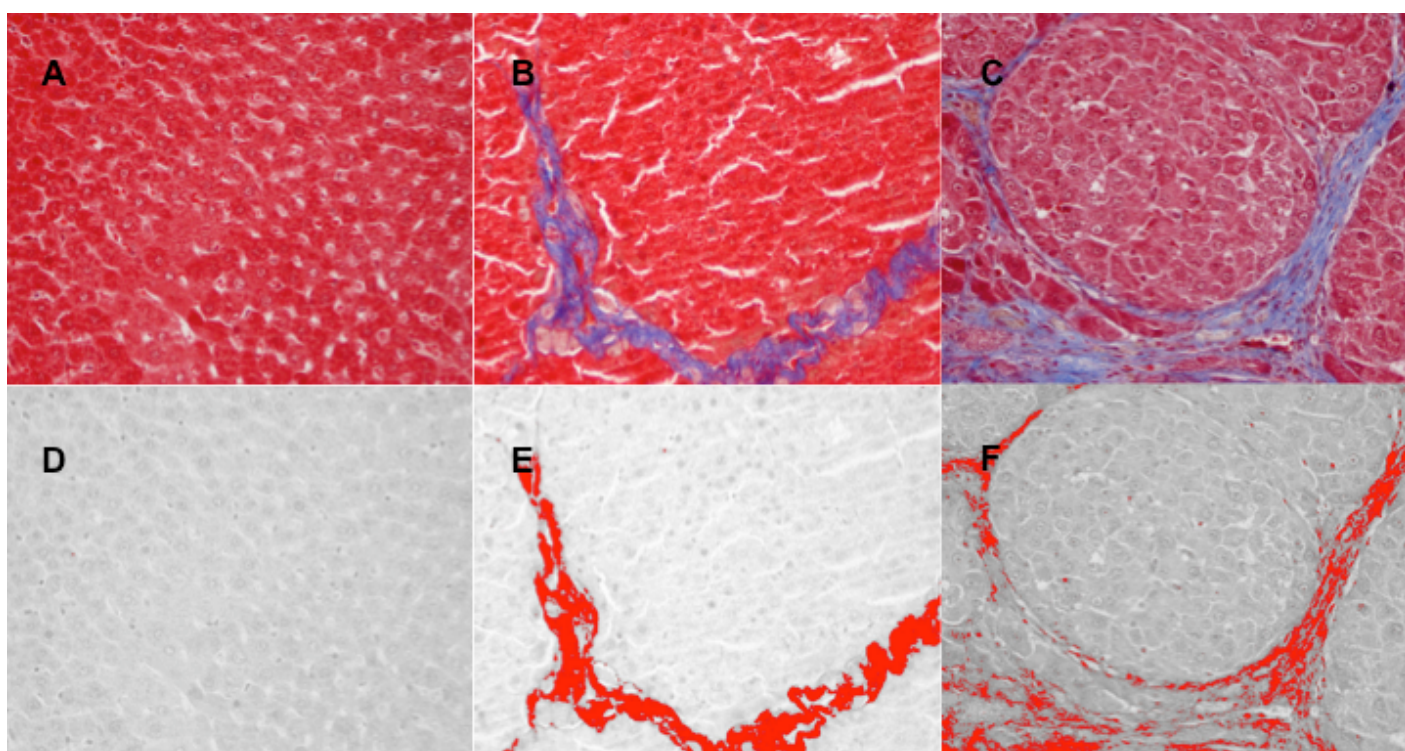


Figura 8. Secciones hepáticas teñidas con tricrómico de Masson para evaluar la fibrosis en ratas del grupo control (H₂O una vez por semana)(A) y en grupos de ratas que siguen el protocolo de administración de CCl₄ de una vez por semana (B) y de dos veces por semana (C) con sus correspondientes imágenes RGB (D a F) (20x). A: hígado del grupo control con preservación de arquitectura hepática; B: Cirrosis hepática establecida con nódulos separados por tabiques fibrosos; C: Cirrosis hepática establecida con mayor grado de fibrosis.

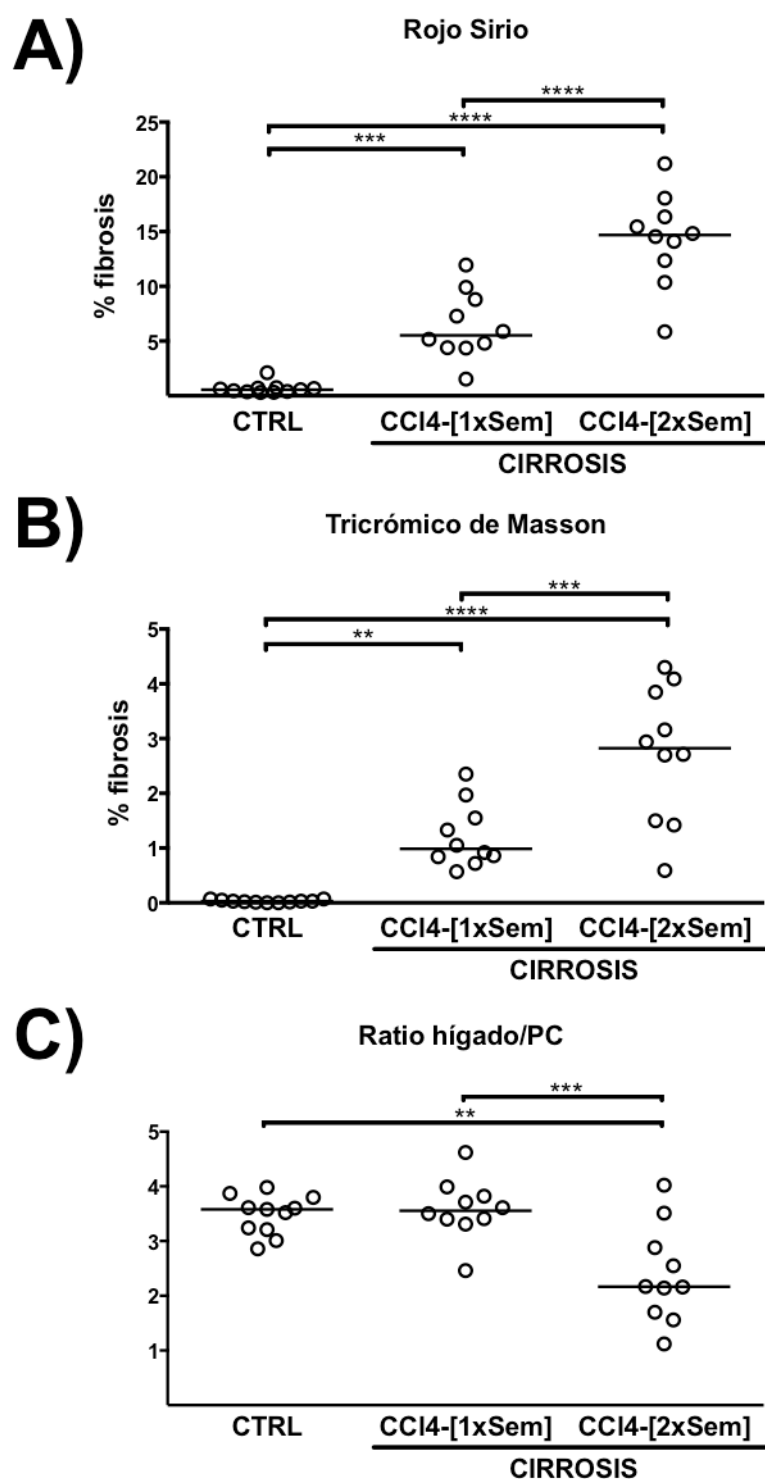


Figura 9: Cuantificación del área de fibrosis hepática (%) con la tinción de rojo Sirio (A) y con el tricrómico de Masson (B), y grado de atrofia hepática (C) en ratas del grupo control (CTRL, H₂O una vez por semana) y en grupos de ratas que siguen el protocolo de administración de CCl₄ de una vez por semana (CCl₄-[1xSem]) y de dos veces por semana (CCl₄-[2xSem]). Cada símbolo representa los valores individuales de cada rata y la línea horizontal la mediana de cada grupo. Abreviaturas: PC: peso corporal; CCl₄: tetracloruro de carbono. ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$; **** = $p < 0,0001$.

Abreviaturas: H₂O: agua; CCl₄: tetracloruro de carbono.

9.1.2. Objetivo I.B: Comparación de los efectos de la anestesia con sevoflurano con los de la anestesia con Ketamina+Diazepam en ratas normales y en ratas con hipertensión portal inducida por la ligadura parcial de la vena porta.

En el **Objetivo I.B**, comparamos las ventajas e inconvenientes de dos protocolos anestésicos distintos, uno inhalado (sevoflurano, **Sevo**) y otro intramuscular (Ketamina+Diazepam, **KD**), para realizar mediciones hemodinámicas en ratas normales (**CTRL**) y en ratas con hipertensión portal inducida por la ligadura parcial de la vena porta (**LPVP**).

Parámetros anatómicos generales

No existieron diferencias respecto al peso corporal al inicio de la anestesia (**CTRL-Sevo**: 388 ± 32 gr vs. **CTRL-KD**: 399 ± 29 gr vs. **LPVP-Sevo**: 388 ± 32 gr vs. **LPVP-KD**: 381 ± 64 gr, $p = 0,35$), aunque los grupos en los que se realizó una LPVP presentaron una ligera pérdida de peso entre el día de la cirugía y el día del estudio hemodinámico (**LPVP-Sevo**: $-5,4 \pm 5,3\%$ vs. **LPVP-KD**: $-3,4 \pm 5,3\%$, $p = 0,41$).

Como era esperable, las ratas de los grupos en las que se realizó una LPVP desarrollaron cierto grado de atrofia hepática, evaluada por el ratio “peso del hígado/peso corporal” (**CTRL-Sevo**: $3,5 \pm 0,4$ gr vs. **CTRL-KD**: $3,3 \pm 0,2$ gr vs. **LPVP-Sevo**: $2,7 \pm 0,2$ gr vs. **LPVP-KD**: $2,7 \pm 0,4$ gr, **Figura 10.A**).

Como reflejo de la hipertensión portal generada, las ratas en las que se realizó una LPVP también desarrollaron esplenomegalia, evaluada por la relación “peso del bazo/peso corporal” (**CTRL-Sevo**: $0,21 \pm 0,02$ gr vs. **CTRL-KD**: $0,18 \pm 0,02$ gr vs. **LPVP-Sevo**: $0,28 \pm 0,04$ gr vs. **LPVP-KD**: $0,25 \pm 0,07$ gr, **Figura 10.B**). El desarrollo de ascitis también fue un hallazgo frecuente en las ratas con LPVP (**LPVP-Sevo**: 66,7% vs. **LPVP-KD**: 41,2 %, $p = 0,39$), aunque fue mínima ($<1,5$ mL) en la gran mayoría de las ratas (sólo 2 ratas tuvieron volúmenes mayores, con 8 y 2 mL). Ninguna de las ratas de los grupos **CTRL-Sevo** y **CTRL-KD** desarrolló ascitis.

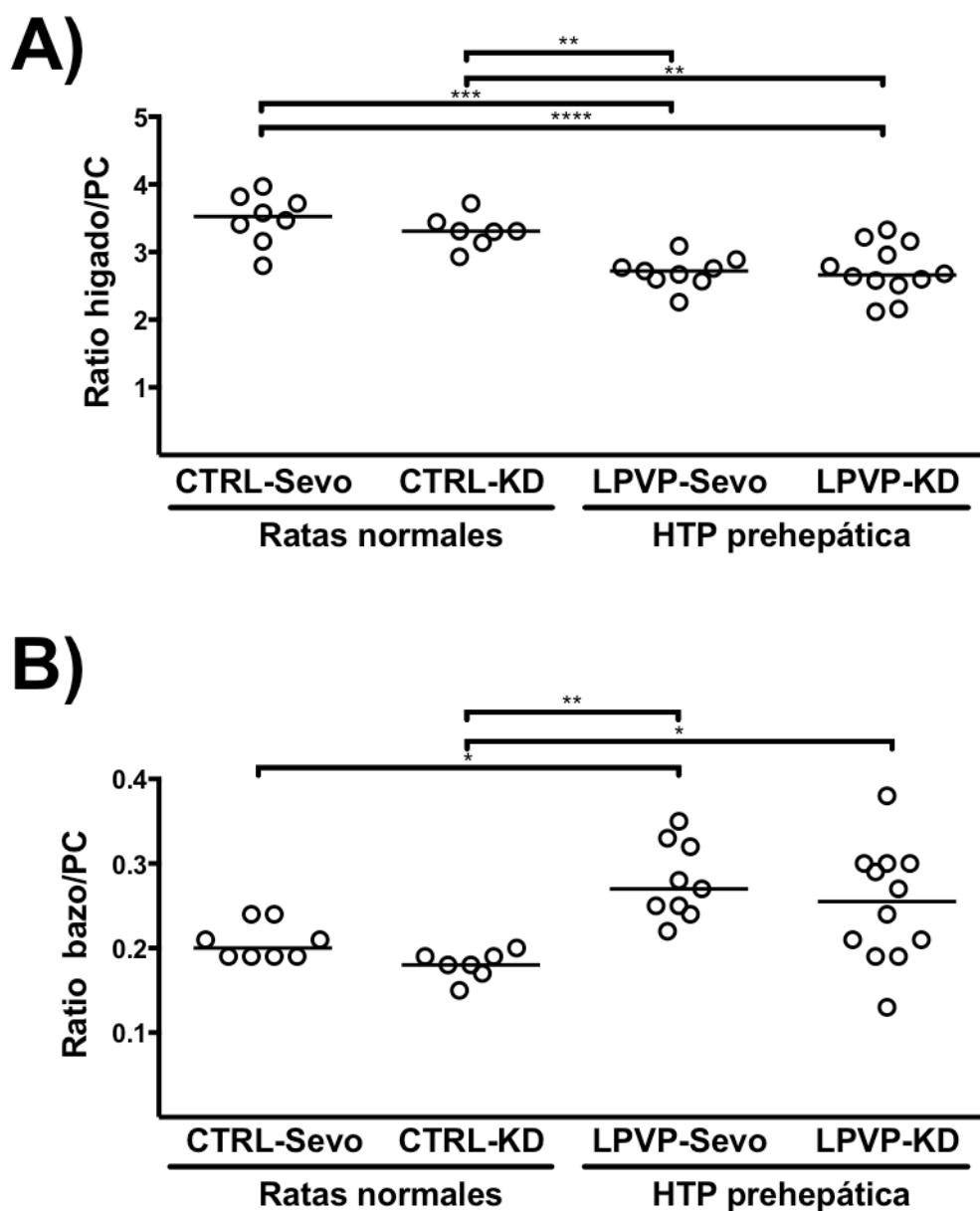


Figura 10: Desarrollo de atrofia hepática (A) y esplenomegalia (B) en ratas sometidas a ligadura parcial de la porta (LPVP) respecto a ratas normales (CTRL) con independencia de la anestesia utilizada (sevoflurano (Sevo) y Ketamina+Diazepam (KD)). Cada símbolo representa los valores individuales de cada rata y la línea horizontal la mediana de cada grupo.

* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$; **** = $p < 0,0001$.

Abreviaturas: PC: peso corporal; HTP: hipertensión portal.

Estabilidad de la anestesia y necesidad de ajuste de dosis

Los dos anestésicos utilizados indujeron una anestesia adecuada tanto en ratas normales como con en ratas con hipertensión portal inducida por la LPVP, pero la anestesia con sevoflurano logró un plano anestésico mucho más estable a juzgar tanto por la necesidad de ajuste de dosis como por las variaciones en la frecuencia respiratoria.

Un total de 12 ratas (50%) necesitaron dosis adicionales de Ketamina+Diazepam frente a sólo 3 ratas (17,6%) que requirieron ajuste de dosis en los grupos de Sevoflurano ($p=0,05$). En concreto, se requirieron dosis adicionales de Ketamina+Diazepam en 6 ratas (54,5%) del grupo **CTRL-KD** (una dosis en 3 ratas, dos dosis en 3 ratas) y en 6 ratas (46,2%) del grupo **LPVP-KD** (una dosis en todas), que se administraron en distintas fases de la anestesia (desde la fase de inducción hasta la del mantenimiento). La anestesia con sevoflurano sólo requirió ajustes en 3 ratas del grupo **CTRL-Sevo**, por ninguna del grupo **LPVP-Sevo** (37,5 y 0 %, respectivamente). Es importante destacar que el periodo de medida de presiones del estudio hemodinámico tuvo una duración fue similar en todos los grupos (**CTRL-Sevo**: $25,8 \pm 5,0$ min vs. **CTRL-KD**: $23,6 \pm 3,6$ min vs. **LPVP-Sevo**: $22,2 \pm 2,0$ min vs. **LPVP-KD**: $22,6 \pm 2,7$ min, $p=0,4$).

Respecto al efecto de la anestesia en la ventilación pulmonar, los grupos anestesiados con Ketamina+Diazepam presentaron no sólo una frecuencia respiratoria que fue prácticamente el doble que la de los grupos anestesiados con sevoflurano (**CTRL-Sevo**: 62 ± 7 rpm vs. **CTRL-KD**: 115 ± 21 rpm vs. **LPVP-Sevo**: 52 ± 7 rpm vs. **LPVP-KD**: 104 ± 16 rpm), sino también una mayor variación intra-grupo de la misma (test de Bartlett de homogeneidad de varianzas, $p=0,0097$, **Figura 11.A**).

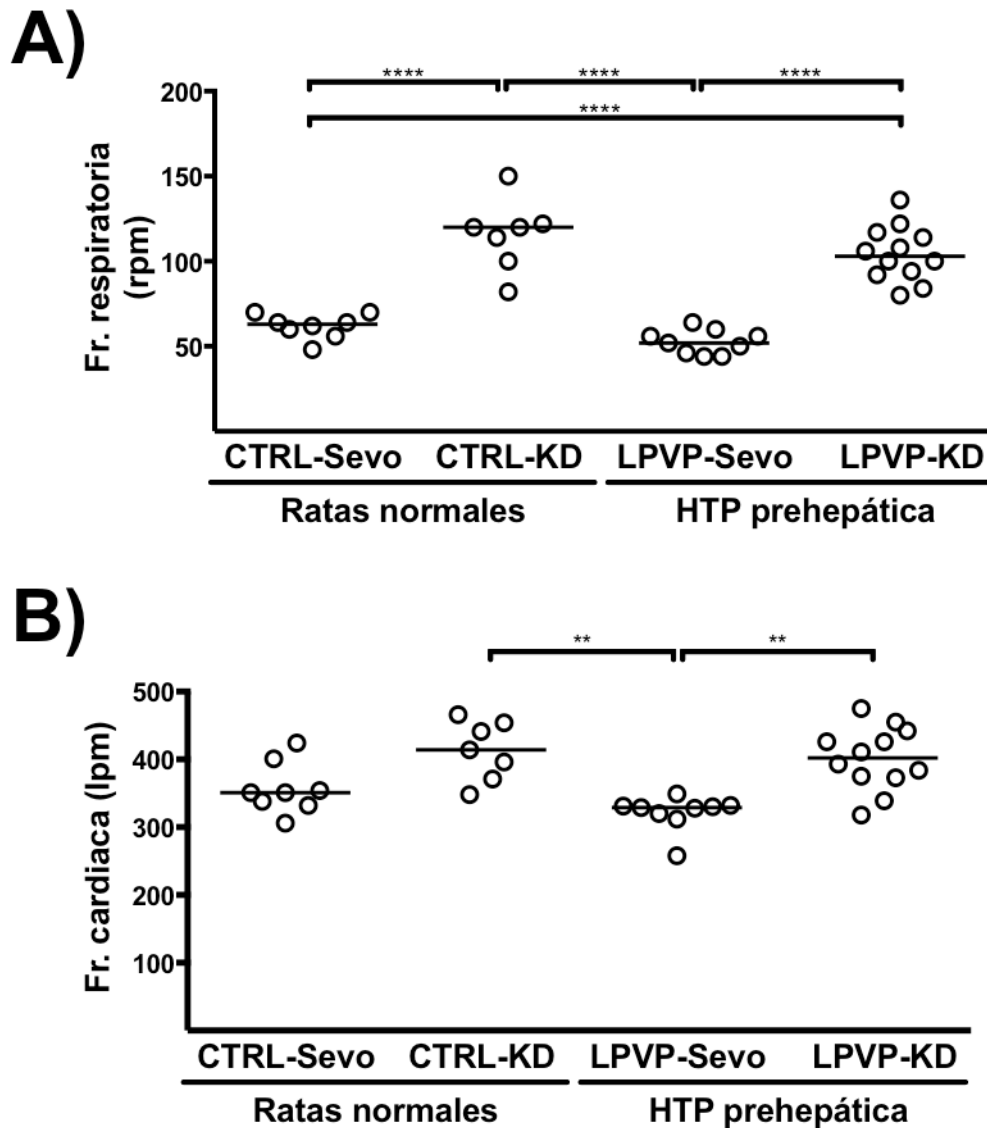


Figura 11: Frecuencia respiratoria (A) y frecuencia cardíaca (B) en ratas normales (CTRL) y en ratas sometidas a ligadura parcial de la vena porta (LPVP) en función de la anestesia utilizada (sevoflurano (Sevo) y Ketamina+Diazepam (KD)). Cada símbolo representa los valores individuales de cada rata y la línea horizontal la mediana de cada grupo.

** = $p < 0,01$; **** = $p < 0,0001$.

Abreviaturas: HTP: hipertensión portal.

Mortalidad durante la anestesia

Los casos de mortalidad durante la anestesia sólo ocurrieron en los grupos de ratas anestesiadas con Ketamina+Diazepam, teniendo el grupo **CTRL-KD** una mortalidad significativamente más alta ($p=0,014$) que el resto (**CTRL-Sevo**: 0% vs. **CTRL-KD**: 36,4% vs. **LPVP-Sevo**: 0% vs. **LPVP-KD**: 7,7%). Al aglutinar los grupos por el tipo de anestesia realizada, se mantuvo la misma tendencia hacia una mayor mortalidad en los grupos anestesiados con Ketamina+Diazepam (grupos **Sevo**: 0% vs. grupos **KD**: 20,8%, $p=0,065$). Todas las muertes ocurrieron de forma similar durante la medición de presiones, varios minutos después de haberse canalizado los vasos. Una hipotensión progresiva de causa no aclarada precedió a todas las muertes sin asociar depresión respiratoria ni hemorragia evidente.

Parámetros hematológicos, bioquímicos y gasométricos

La **Tabla 13** muestra los resultados hematológicos y bioquímicos de cada grupo. Las ratas del grupo **CTRL-KD** tuvieron valores más elevados de recuento de hematíes, hemoglobina y hematocrito que el resto de los grupos ($p<0,01$). Los dos grupos sometidos a LPVP tuvieron unos valores de fibrinógeno y sodio más elevados, y unas cifras de glucosa y fosfatasa alcalina más bajas ($p<0,05$).

El tipo de anestesia pareció influir en algunos parámetros analíticos relevantes. En comparación con los grupos en los que se utilizó sevoflurano, aquellos anestesiados con Ketamina+Diazepam tuvieron unas cifras más altas de AST y lactato ($p<0,05$), y más bajas de bicarbonato ($p<0,05$) (**Tabla 13** y **Figura 12**). Esta diferencia en los niveles de AST fue significativa solamente entre el grupo **CTRL-Sevo** y los dos grupos anestesiados con Ketamina-Diazepam ($p<0,05$). La mayor presión parcial de oxígeno en los grupos anestesiados con sevoflurano fue debida a la suplementación con oxígeno necesaria para vehiculizar el sevoflurano (**Tabla 13**).

Tabla 13. Parámetros hematológicos, bioquímicos y gasométricos[#]

	CTRL-Sevo	CTRL-KD	LPVP-Sevo	LPVP-KD
Hematíes (10x6/ μ L)	7,1 \pm 0,8	9,1 \pm 0,9 **	6,4 \pm 0,5	7,2 \pm 0,7
Hemoglobina (gr/dl)	14,6 \pm 1,6	18,2 \pm 1,5 ***	12,4 \pm 0,6 $^{\delta}$	13,7 \pm 0,9
Hematocrito (%)	41,0 \pm 4,2	51,7 \pm 4,5 ***	35,5 \pm 2,0	39,6 \pm 2,5
Volumen corpuscular medio (fL)	57,7 \pm 1,3	56,7 \pm 2,2	55,3 \pm 2,1	55,1 \pm 2,8
Leucocitos (10x3/ μ L)	1,4 \pm 0,6	3,3 \pm 1,3	6,0 \pm 3,3	4,8 \pm 4,6
Fórmula (%)				
• Polimorfonuclear	9,7 (2,6-21,6)	5,3 (2,0-17,4)	8,4 (4,8-69,3)	5,4 (0,9-12,5)
• Linfocitos	73,3 (48,0-80,4)	90,3 (73,7-92,5)	82,8 (25,5-94,3)	76,8 (37,2-90,8)
• Monocitos	17 (1,7-28,2)	5,4 (1-10,3)	5,7 (0,9-10,4)	14 (6,7-59,9)
• Eosinófilos	1,4 (0,2-1,9)	0 (0-1,1)	0,2 (0-1,1)	0,1 (0-1,2)
• Basófilos	0,2 (0-20,8)	0,6 (0,2-4,6)	0,4 (0-0,4)	0,35 (0-0,7)
Plaquetas (10x3/ μ L)	864 \pm 98	929 \pm 91	918 \pm 136	916 \pm 120
Tiempo de protrombina (segundos)	11,5 \pm 0,6	13,1 \pm 2,2	12,1 \pm 0,8	12 \pm 2,1
INR	1,06 \pm 0,06	1,14 \pm 0,16	1,11 \pm 0,06	1,1 \pm 0,19
Fibrinógeno (mg/dL)	209 \pm 26	200 \pm 31	310 \pm 32 $^{\xi}$	327 \pm 64 $^{\xi}$
Glucosa (mg/dL)	245 \pm 54	288 \pm 127	162 \pm 22 $^{\wedge}$	164 \pm 45 $^{\wedge}$
ALT (U/L)	26 \pm 3	34 \pm 4	29 \pm 9	44 \pm 25
AST (U/L)	62 \pm 24	123 \pm 33 $^{\delta}$	74 \pm 32	119 \pm 31 $^{\delta}$
Bilirrubina total (mg/dL)	0,1 \pm 0	0,08 \pm 0,04	0,13 \pm 0,05	0,11 \pm 0,04
FA (U/L)	146 \pm 53	119 \pm 19	66 \pm 20 $^{\xi}$	64 \pm 17 $^{\xi}$
Albúmina (g/dL)	3,2 \pm 0,2	3 \pm 0,6	2,8 \pm 0,3	2,9 \pm 0,4
LDH (U/L)	243 (142-671)	582 (208-840)	167 (113-436)	434 (306-884)
Creatinina (mg/dL)	0,34 \pm 0,11 $^{\wedge}$	0,57 \pm 0,17	0,32 \pm 0,1 $^{\wedge}$	0,49 \pm 0,08
Urea (mg/dL)	28 \pm 3	30 \pm 4	37 \pm 13	37 \pm 21
Na (mmol/L)	137 \pm 1	137 \pm 1	142 \pm 2 $^{\xi}$	142 \pm 3 $^{\xi}$
K (mmol/L)	5,5 \pm 0,5	6,6 \pm 1,2	4,9 \pm 0,9	5,7 \pm 1,6
pH	7,47 \pm 0,06 $^{\wedge}$	7,38 \pm 0,02	7,46 \pm 0,04 $^{\wedge}$	7,42 \pm 0,07
pCO2 (mm Hg)	35 \pm 6	30 \pm 13	40 \pm 5	34 \pm 7
pO2 (mm Hg)	466 \pm 28 $^{\theta\theta}$	84 \pm 25	429 \pm 45 $^{\theta\theta}$	79 \pm 6
HCO3 (mmol/L)	25 \pm 2	16 \pm 6 *	28 \pm 2,4	22 \pm 3,3 $^{\varphi}$
Lactato (mmol/L)	2 \pm 0,7 $^{\theta}$	4 \pm 2,1	2 \pm 0,6 $^{\theta}$	4 \pm 0,9

Los valores se expresan como media \pm SD o mediana (rango).

Se dispuso de analíticas en 5 ratas de cada grupo CTRL y en 6 de cada grupo de LPVP

δ p < 0,05 comparado con el grupo CTRL-Sevo

ξ p < 0,05 comparado con los grupos CTRL-Sevo y CTRL-KD

$^{\wedge}$ p < 0,05 comparado con el grupo CTRL-KD

φ p < 0,05 comparado con el grupo LPVP-Sevo

θ p < 0,05; $\theta\theta$ p < 0,0001 comparado con los grupos CTRL-KD y LPVP-KD

* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001 comparado con el resto de grupos

Abreviaturas: ALT: alanina aminotransferasa; AST: aspartato aminotransferasa; FA: fosfatasa alcalina; HCO3: bicarbonato; INR: international normalized ratio; K: potasio; LDH: lactato deshidrogenasa; Na: sodio; pCO2: presión parcial de dióxido de carbono; pO2: presión parcial de oxígeno.

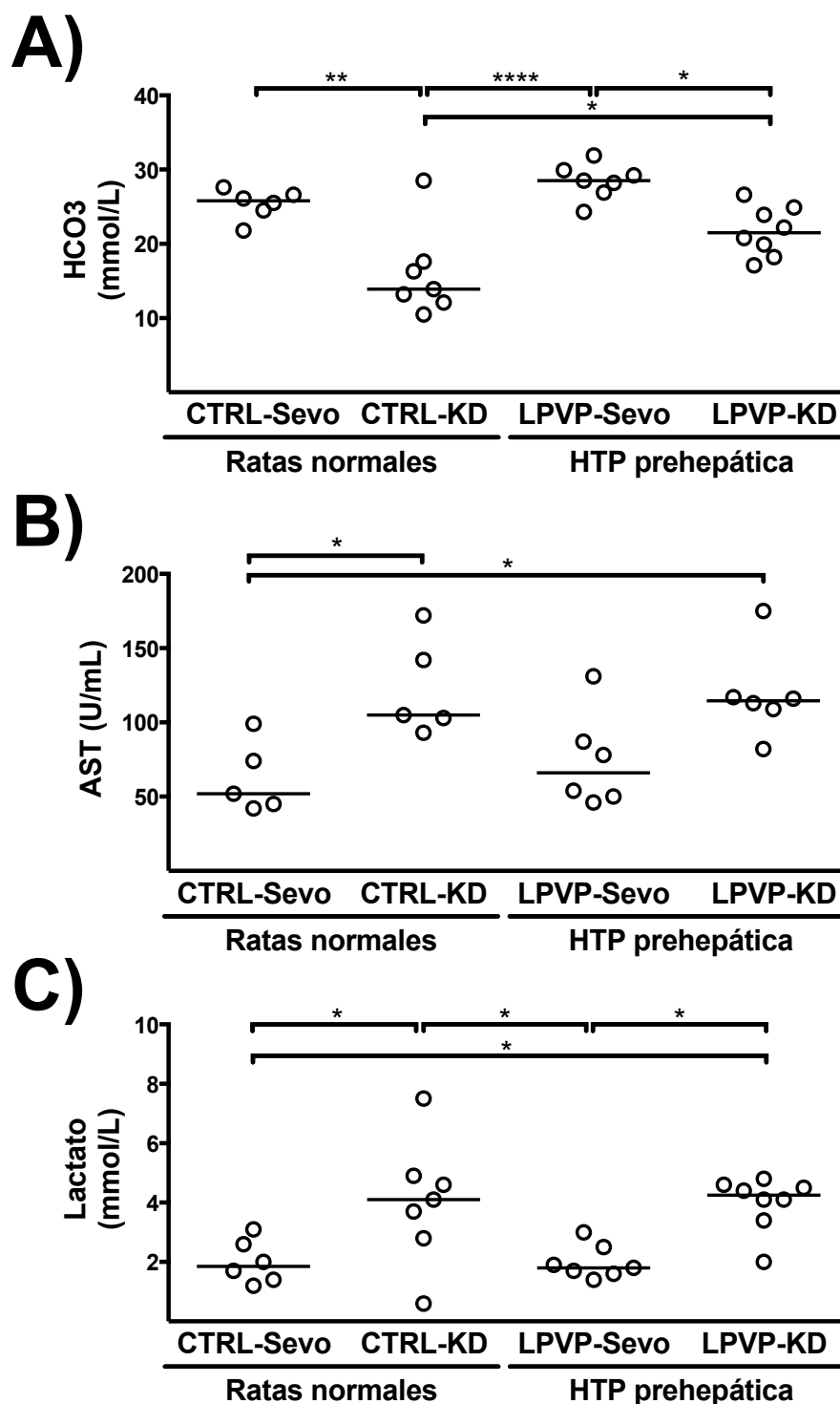


Figura 12: Niveles en sangre de bicarbonato (A), AST (B) y lactato (C) en ratas normales (CTRL) y en ratas sometidas a ligadura parcial de la porta (LPVP) en función de la anestesia utilizada (sevoflurano (Sevo) y ketamina-Diazepam (KD)). Cada símbolo representa los valores individuales de cada rata y la línea horizontal la mediana de cada grupo.

* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; **** = $p < 0,0001$.

Abreviaturas: HCO₃: bicarbonato; AST: aspartato aminotransferasa; HTP: hipertensión portal.

Parámetros hemodinámicos sistémicos

La frecuencia cardíaca fue mayor en los dos grupos anestesiados con Ketamina+Diazepam comparados con el grupo **LPVP-Sevo** y, casi alcanzando significación estadística, con el grupo **CTRL-Sevo** ($p=0,051$ vs. **CTRL-KD** y $p=0,09$ vs. **LPVP-KD**) (Tabla 14 y Figura 11.B). La presión arterial media y la presión venosa central fueron similares en todos los grupos (Tabla 14).

Tabla 14. Parámetros cardio-respiratorios .

	CTRL-Sevo (n=8)	CTRL-KD (n=11)^a	LPVP-Sevo (n=9)	LPVP-KD (n=13)^a
<i>FC (latidos/min)</i>	357 ± 38	413 ± 44	321 ± 26 ^θ	401 ± 47
<i>PAM (mm Hg)</i>	83,4 ± 10,8	87,0 ± 19,6	85,2 ± 4,2	96,5 ± 14,3
<i>PVC (mm Hg)</i>	2,2 ± 2,4	0,2 ± 1,4	1,6 ± 1,7	1,9 ± 1,1

Los valores se expresan como media ± SD.

^a Cuatro ratas del grupo CTRL-KD y 1 rata del grupo LPVP-KD fallecieron durante el estudio hemodinámico.* $p < 0,01$ comparado con los grupos CTRL-KD y LPVP-KD.

^θ $p < 0,05$ comparado con el grupo K+D

Abreviaturas: PAM: presión arterial media; PP: presión portal; PVC: presión venosa central; FC: frecuencia cardíaca al final del experimento; FR: frecuencia respiratoria al final del experimento; PC: peso corporal el día del estudio hemodinámico

Medición de la presión portal

El tipo de anestesia no pareció interferir en la medición de la presión portal ni en las ratas normales ni en las ratas con hipertensión portal inducida por la LPVP. Así, las ratas sometidas a una LPVP presentaron una presión portal más elevada que las ratas normales independientemente de la anestesia realizada (**CTRL-Sevo**: $5,5 \pm 2,0$ mmHg vs. **CTRL-KD**: $5,8 \pm 0,7$ mmHg vs. **LPVP-Sevo**: $12,8 \pm 2,2$ mmHg vs. **LPVP-KD**: $12,2 \pm 2,3$ mmHg, $p < 0,0001$) (Figura 13).

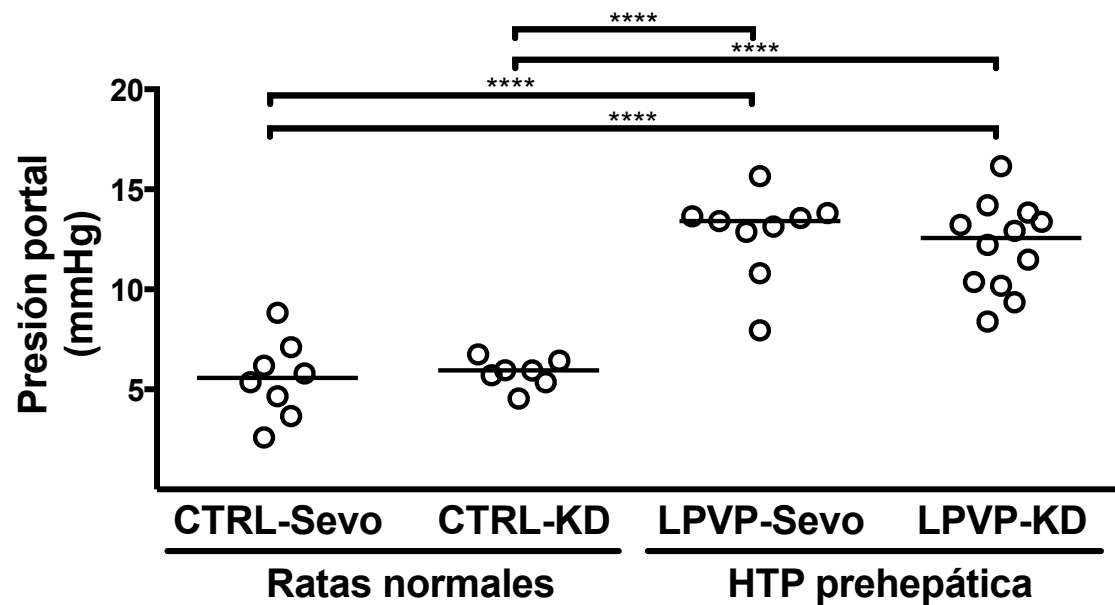


Figura 13: Presión portal en ratas normales (CTRL) y en ratas sometidas a ligadura parcial de la vena porta (LPVP) medida bajo anestesia con sevoflurano (Sevo) o con la combinación Ketamina+Diazepam (KD). Cada símbolo representa los valores individuales de cada rata y la línea horizontal la mediana de cada grupo.

**** = $p < 0,0001$.

Abreviaturas: HTP: Hipertensión portal.

9.2. OBJETIVO II: Determinar los efectos de la enoxaparina, incluyendo la evaluación de distintas dosis, sobre la fibrosis hepática, la hipertensión portal y la disfunción endotelial, utilizando 3 modelos experimentales de cirrosis hepática.

El objetivo central del presente trabajo de Tesis Doctoral fue evaluar la utilidad terapéutica de la anticoagulación con enoxaparina, una heparina de bajo peso molecular, para influir la historia natural de la cirrosis hepática y sus complicaciones.

En base a los resultados previos del OBJETIVO I, para evaluar el efecto de la enoxaparina elegimos el protocolo de inducción de cirrosis hepática por administración oral de CCl₄ dos veces por semana por su mayor reproducibilidad, y para realizar las mediciones hemodinámicas elegimos el régimen anestésico con sevoflurano por su mayor estabilidad. Los efectos de la enoxaparina los evaluamos además en ratas con cirrosis hepática inducida por la ligadura del colédoco y en ratas con cirrosis inducida por la administración de CCl₄ inhalado.

9.2.1. Objetivo II.A: Evaluación de los efectos de la enoxaparina en ratas con cirrosis hepática inducida por la administración oral de CCl₄ y en ratas con cirrosis hepática inducida por la ligadura del colédoco.

Los experimentos del Objetivo II.A incluyeron la evaluación de dos dosis distintas de enoxaparina (40 UI/Kg/24h sc y 180 UI/Kg/24h sc) en ratas con cirrosis hepática inducida por la administración de CCl₄ oral, y de la dosis alta de enoxaparina (180 UI/Kg/24h sc) en ratas con cirrosis biliar inducida por la LC.

Mortalidad

En el modelo de cirrosis hepática inducida por la administración de CCl₄ oral, ninguna de las ratas de los grupos controles (grupos **Veh**) falleció a lo largo del estudio, independientemente de recibir o no tratamiento con enoxaparina. La administración de CCl₄ sí se acompañó de una mortalidad considerable, que fue del 17%, 30% y 71%, respectivamente, en los grupos **CCl₄-Sal**, **CCl₄-Enox40**, y **CCl₄-Enox180**. Sólo el grupo **CCl₄-Enox180** presentó una mortalidad significativamente superior al resto ($p=0,0014$ vs. **Veh-Sal**, **Veh-Enox40** y **Veh-Enox180**, y $p=0,04$ vs. **CCl₄-Sal** y **CCl₄-Enox180**). Debido a su elevada mortalidad y al escaso número de ratas supervivientes ($n=2$) al final del estudio, el grupo **CCl₄-Enox180** fue excluido del resto de análisis.

En el modelo de cirrosis hepática inducida por la LC, 3 ratas del grupo **LC-Sal** y 1 del **LC-Enox180** fallecieron como consecuencia de complicaciones quirúrgicas en la primera semana tras la realización de la LC, por lo que no se incluyeron en el análisis del efecto de la enoxaparina sobre la supervivencia. Posteriormente, tan sólo 1 rata perteneciente al grupo **LC-Enox180** falleció prematuramente por disfunción hepática avanzada en la semana 4. Por tanto, la mortalidad en este modelo fue prácticamente nula y no hubo diferencias significativas entre grupos ($p=0,58$) que sugiriesen influencia alguna del tratamiento con enoxaparina.

Ganancia de peso corporal

En el modelo de administración oral de CCl₄, la inducción de cirrosis se acompañó de una tendencia a presentar un menor peso corporal a la finalización del estudio (**Veh-Sal**: 495 ± 50 gr vs. **Veh-Enox40**: 527 ± 40 gr vs. **CCl₄-Sal**: 477 ± 70 gr vs. **CCl₄-Enox40**: 427 ± 52 gr), pero sólo existieron diferencias significativas entre los grupos **Veh-Enox40** y **CCl₄-Enox40** ($p=0,024$).

En el modelo de cirrosis biliar, las ratas con LC, independientemente de recibir o no tratamiento con enoxaparina, presentaron un peso corporal marcadamente inferior a la finalización del estudio en comparación con las ratas con cirugía “sham” (**Sham-**

Sal: 471±36 gr vs. **Sham-Enox180:** 461±21 gr vs. **LC-Sal:** 361±45 gr vs. **LC-Enox180:** 350±33, $p < 0,0001$ grupos **LC** vs. grupos **Sham**).

Parámetros hematológicos y bioquímicos

Los valores analíticos sanguíneos de cada grupo en los dos modelos experimentales están resumidos en la **Tabla 15**. En el modelo de cirrosis por CCl₄, los dos grupos de ratas que recibieron CCl₄ (**CCl₄-Sal** y **CCl₄-Enox40**) presentaron valores elevados de AST ($p < 0,001$), ALT ($p < 0,01$), FA ($p < 0,01$), e INR ($p < 0,05$) así como cifras bajas de plaquetas ($p < 0,05$), glucosa ($p < 0,05$), proteínas totales ($p < 0,01$) y albúmina ($p < 0,0001$) comparado con los grupos de ratas control, pero no se observaron diferencias en estos parámetros entre aquellas que recibían salino y las que recibían enoxaparina. Sólo el grupo **CCl₄-Enox40** desarrolló una disminución significativa de fibrinógeno ($p < 0,01$) y elevaciones significativas de la bilirrubina ($p < 0,01$) y de kalemia ($p < 0,05$) comparado con los grupos controles, aunque el grupo **CCl₄-Sal** presentó una tendencia en el mismo sentido. No se observaron diferencias en otros parámetros gasométricos, de equilibrio ácido-base, de función renal o de electrolitos entre ninguno de los grupos.

En el modelo de cirrosis biliar se evaluó un menor número de parámetros. Sólo el grupo de ratas **LC-Sal** presentó elevaciones significativas de la bilirrubina ($p < 0,01$) y del INR ($p < 0,05$) en comparación con los grupos de ratas con cirugía “sham” (**Sham-Sal** y **Sham-Enox180**); aunque estos parámetros también presentaron una clara tendencia a elevarse en el grupo **LC-Enox180** respecto a los grupos **Sham**, dichos cambios no alcanzaron significación estadística (bilirrubina, $p = 0,06$ (**vs. Sham-Sal**) y $p = 0,08$ (**vs. Sham-Enox18**); INR, $p = 0,33$ (**vs. Sham-Sal**) y $p = 0,15$ (**vs. Sham-Enox18**)). De manera similar, los grupos de ratas con **LC** presentaron valores de AST elevados comparados con los grupos de ratas **Sham**, pero dicha elevación sólo alcanzó significación estadística en el grupo **LC-Enox180** ($p < 0,05$). En cualquier caso, no hubo diferencias entre los grupos **LC-Sal** y **LC-Enox180** en ninguno de los parámetros explorados.

Tabla 15. Parámetros hematológicos y bioquímicos.

	Modelo de cirrosis por CCl4				Modelo de cirrosis por LC			
	Veh-Sal	Veh-Enox40	CCl4-Sal	CCl4-Enox40	Sham-Sal	Sham-Enox180	LC-Sal	LC-Enox180
Hemoglobina (gr/dl)	13,9 ± 0,5	14,3 ± 0,4	13,2 ± 0,8	13,2 ± 1,6				
Leucocitos (10x3/μL)	1,3 (0,8-1,6)	1,2 (1-1,5)	7,2 (2,6-15,8)	6,6 (5,3-15,1)				
Plaquetas (10x3/μL)	840 ± 67	925 ± 64	542 ± 246 ^ζ	421 ± 257 ^{**}				
INR	1,14 ± 0,09	1,13 ± 0,08	1,41 ± 0,19 *	1,48 ± 0,18 ^{**}	0,97 ± 0,06	0,92 ± 0,04	1,6 ± 0,52 ^δ	1,47 ± 0,48
Fibrinógeno (mg/dL)	204 ± 25	201 ± 24	141 ± 61	103 ± 41 ^{**}				
Glucosa (mg/dL)	178 ± 33	215 ± 20	130 ± 32 *	115 ± 24 ^{**}				
ALT (U/L)	36 ± 10	26 ± 4	73 ± 20 ^{**}	93 ± 19 ^{****}	27 ± 10	36 ± 6	28 ± 11	43 ± 14
AST (U/L)	66 ± 23	51 ± 13	213 ± 68 ^{***}	279 ± 42 ^{****}	48 ± 9	68 ± 5	214 ± 66	262 ± 121 ^θ
Bilirrubina (mg/dL)	0,1 ± 0	0,1 ± 0	0,6 ± 0,5	1,1 ± 0,3 ^{**}	0,3 (0,2-1,2)	0,5 (0,1-0,5)	4,8 (3,2-5,8) ^{θθ}	3,2 (1,2-4,8)
FA (U/L)	66 ± 13	61 ± 8	227 ± 100 ^{**}	242 ± 51 ^{***}	192 ± 107	237 ± 39	211 ± 78	335 ± 98
Albúmina (g/dL)	3,6 ± 0,1	3,5 ± 0,2	2,3 ± 0,5 ^{****}	2,2 ± 0,2 ^{****}				
Proteínas totales (g/dL)	5,3 ± 0,1	5,4 ± 0,2	4,2 ± 0,6 ^{***}	4,2 ± 0,4 ^{**}				
Creatinina (mg/dL)	0,27 ± 0,05	0,26 ± 0,04	0,26 ± 0,12	0,24 ± 0,06				
Urea mg/dL)	23 ± 3	20 ± 5	21 ± 3	24 ± 3				
Na (mmol/L)	140 ± 2	140 ± 2	139 ± 2	141 ± 3				
K (mmol/L)	4,1 ± 0,3	4,1 ± 0,2	4,5 ± 0,3	5,2 ± 1 *				

Los valores se expresan como media ± SD o mediana (rango).

* p< 0,05; ** p< 0,01, *** p< 0,001; **** p< 0,0001 comparado con los grupos Veh.

ζ p< 0,05 comparado con Veh-Enox40.

θ p< 0,05 comparado con grupos Veh y CCl4-Sal

θ p< 0,05 comparado con grupos Sham

θθ p< 0,01 comparado con grupos Sham

δ p< 0,05 comparado con grupo Sham-Enox180

Abreviaturas: ALT: alanina aminotransferasa; AST: aspartato aminotransferasa; FA: fosfatasa alcalina; HCO3: bicarbonato; INR: international normalized ratio; K: potasio; LDH: lactato deshidrogenasa; Na: sodio.

Desarrollo de fibrosis hepática

Tanto el modelo de administración de CCl₄ (**Figura 14 y 15**) como el de LC (**Figuras 16 y 17**) resultaron de forma consistente el desarrollo de cirrosis hepática, mientras que la arquitectura hepática estuvo completamente preservada en todas las ratas de los respectivos grupos control.

El área de fibrosis hepática, cuantificada en secciones de tejido hepático teñidas con rojo Sirio, fue mayor en las ratas con cirrosis en comparación con sus respectivos controles tanto en el modelo de cirrosis inducida por administración de CCl₄ (**Veh-Sal**: 0,55±0,22 % vs. **Veh-Enox40**: 0,63±0,14 % vs. **CCl₄-Sal**: 14,3±4,19 % vs. **CCl₄-Enox40**: 16,26±4,55 %, **Figura 14.A y 15**), como en el modelo de cirrosis inducida por LC (**Sham-Sal**: 0,25±0,08 % vs. **Sham-Enox180**: 0,38±0,30 % vs. **LC-Sal**: 9,2±4,48 % vs. **LC-Enox180**: 11,25±5,70 %, **Figura 16.A y 17**). El tratamiento con enoxaparina no indujo ningún cambio perceptible en la extensión de la fibrosis evaluada por rojo Sirio ni en los grupos controles ni en los grupos de ratas con cirrosis inducida por CCl₄ o por la LC. En el modelo de cirrosis por CCl₄, la extensión de la fibrosis fue evaluada también con la tinción tricrómica de Masson. Los resultados fueron similares a los del rojo Sirio salvo porque, en este caso, el tratamiento con enoxaparina se asoció además a un aumento significativo del área de fibrosis en ratas con cirrosis (**Veh-Sal**: 0,03±0,03 % vs. **Veh-Enox40**: 0,09±0,04 % vs. **CCl₄-Sal**: 2,73±1,23 % vs. **CCl₄-Enox40**: 4,94±2,3 %, ver **Figura 14.B**).

El modelo de cirrosis inducida por CCl₄ y el modelo de cirrosis inducida por la LC resultaron en cambios contrapuestos en la masa hepática, con el desarrollo de atrofia hepática en el primero y de hipertrofia hepática en el segundo. Así, la relación “peso del hígado/peso corporal” fue menor en los grupos de ratas que recibieron CCl₄ que en sus correspondientes controles (**Veh-Sal**: 3,5±0,3 vs. **Veh-Enox40**: 3,4±0,3 vs. **CCl₄-Sal**: 2,5±0,8 vs. **CCl₄-Enox40**: 2,1±0,5, ver **Figura 14.C**) y, al contrario, fue mayor en los grupos de ratas con cirrosis inducida por la LC que en sus correspondientes controles “sham” (**Sham-Sal**: 3,6±0,2 vs. **Sham-Enox180**: 3,9±0,4 vs. **LC-Sal**: 7,6±0,6 vs. **LC-Enox180**: 6,4±1,4, ver **Figura 16.B**). Al igual que en el caso de la fibrosis, el tratamiento

con enoxaparina no tuvo influencia alguna en este parámetro ni en las ratas controles ni en las ratas con cirrosis en ninguno de los dos modelos experimentales utilizados.

Para evaluar más finamente posibles efectos del tratamiento con enoxaparina en el desarrollo de fibrosis, analizamos la expresión en el hígado de los genes *Col1a1* (colágeno tipo-1), *Acta2* (alpha-smooth muscle actin) y *Timp1* (tissue inhibitor of metalloproteinases-1), todos ellos genes involucrados en el desarrollo de fibrosis. En todos los casos, el tratamiento con enoxaparina no tuvo influencia alguna sobre la expresión basal de estos genes evaluada en las ratas controles ni tampoco sobre la inducción de los mismos observada en ratas con cirrosis tanto en el modelo experimental de administración de CCl₄ oral (**Figura 18.A,C,E**) como en el modelo de cirrosis biliar inducida por LC (**Figura 18.B,D,F**).

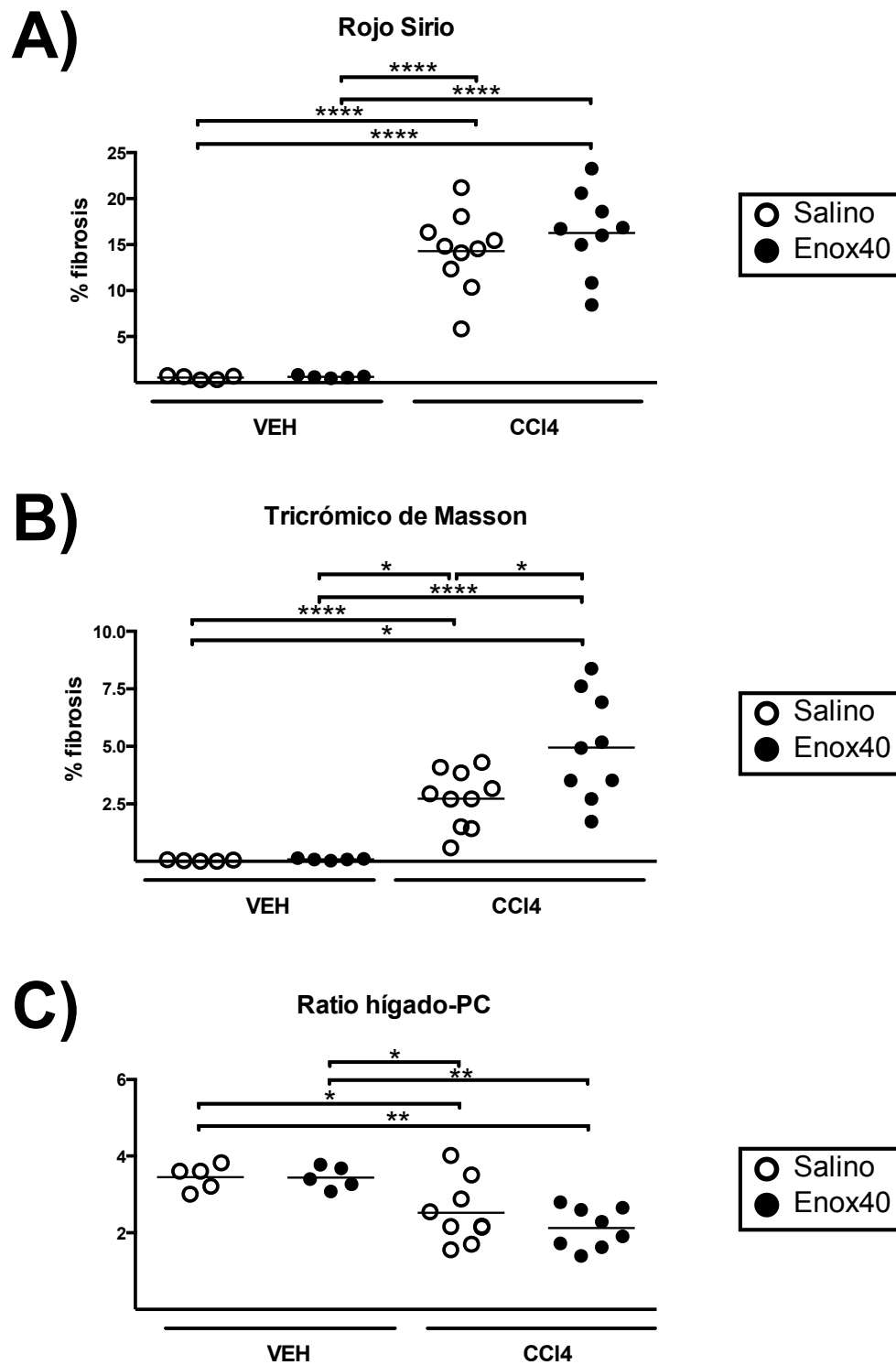


Figura 14: Cuantificación del área de fibrosis (%) en secciones de hígado teñidas con la tinción de rojo Sirio (A) y o con tricrómico de Masson (B), y grado de atrofia hepática (C) en el modelo de cirrosis hepática inducida por la administración oral de CCl₄. Cada símbolo representa los valores individuales de cada rata y la línea horizontal la mediana de cada grupo.

Abreviaturas: PC: peso corporal; VEH: vehículo (agua); CCl₄: tetracloruro de carbono; Enox40: enoxaparina 40 UI/kg/24h.

* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; **** = $p < 0,0001$.

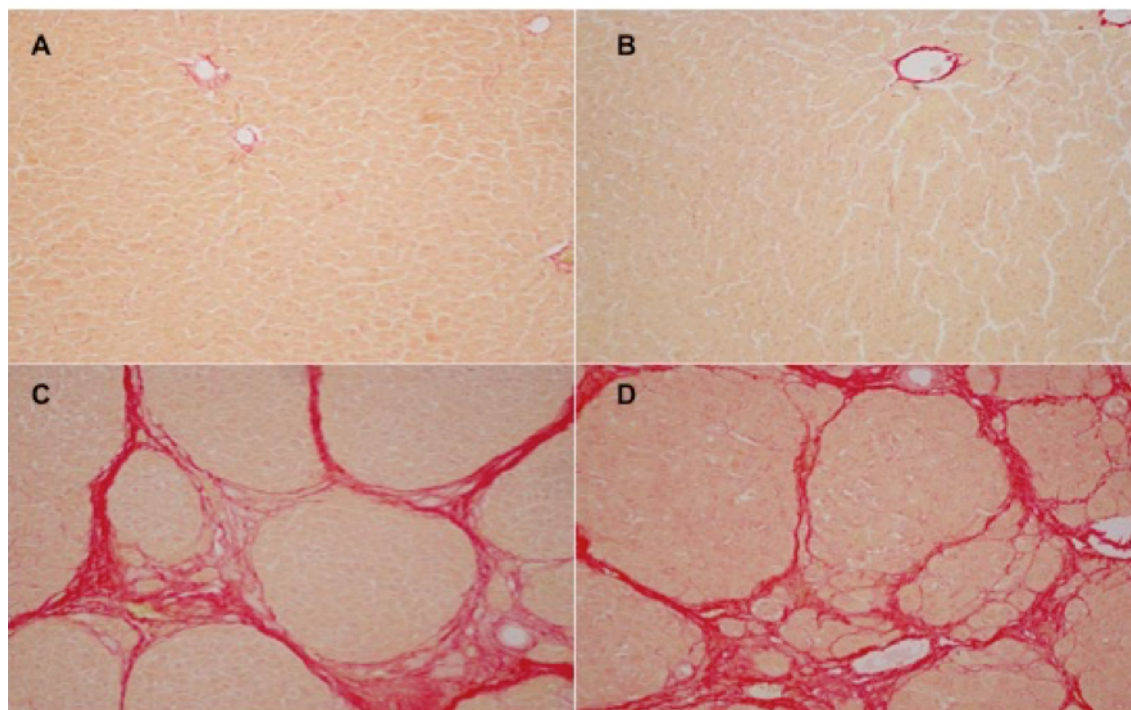


Figura 15. Secciones hepáticas teñidas con rojo Sirio para evaluar la fibrosis en ratas de los grupos control (H₂O una vez por semana) tratadas con salino (A) o con 40 UI/kg/24h de enoxaparina (B), y en ratas con cirrosis inducida por la administración de tetracloruro de carbono tratadas con salino (C) o con enoxaparina 40 UI/kg/24h (D) (10x). A y B: hígados con preservación de arquitectura hepática; C y D: Cirrosis hepática establecida, con nódulos separados por tabiques fibrosos, sin existir diferencias en el grado de fibrosis entre los dos grupos.

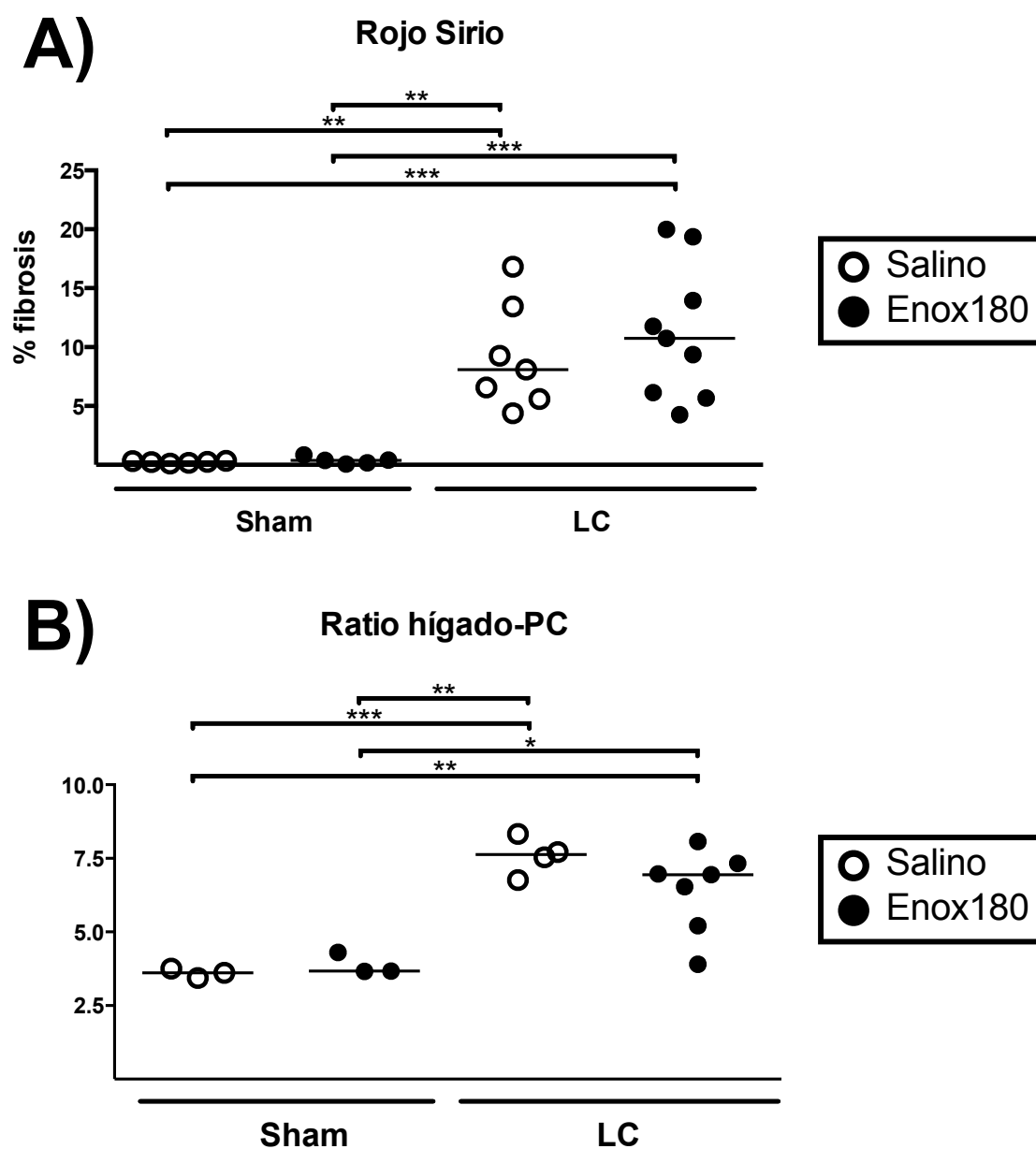


Figura 16: Cuantificación del área de fibrosis (%) en secciones de hígado teñidas con la tinción de rojo Sirio (A) y grado de atrofia hepática (B) en ratas con cirrosis biliar inducida por la ligadura del colédoco (LC). Cada símbolo representa los valores individuales de cada rata y la línea horizontal la mediana de cada grupo.

Abreviaturas: PC: peso corporal; Enox180: enoxaparina 180 UI/kg/24h.

* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$.

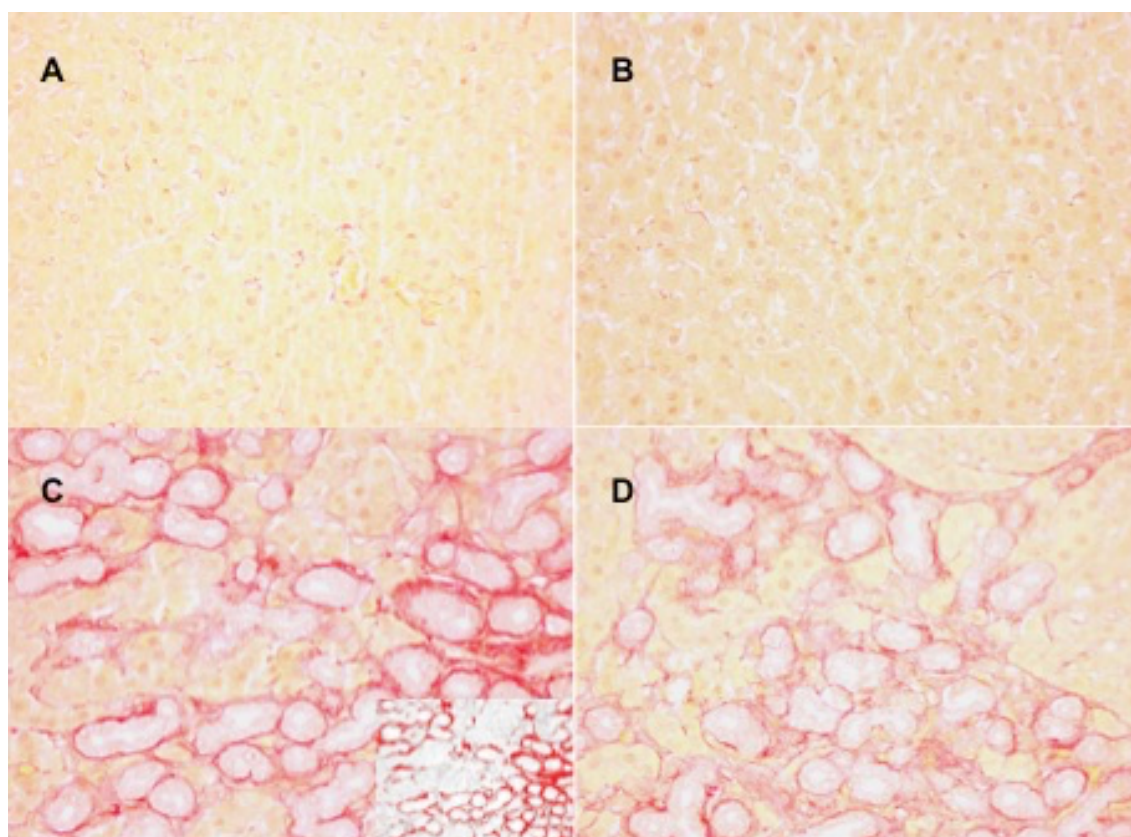


Figura 17. Secciones hepáticas teñidas con rojo Sirio para evaluar el área de fibrosis en ratas de los grupos sham tratadas con salino (A) o con 180 UI/kg/24h de enoxaparina (B), y en ratas con cirrosis inducida por la ligadura del colédoco tratadas con salino (C) o con enoxaparina 180 UI/kg/24h (D) (10x). A y B: hígados con preservación de arquitectura hepática; C y D: Proliferación colangiolar marcada con expansión fibrosa portal, sin existir diferencias en el grado de fibrosis entre los dos grupos.

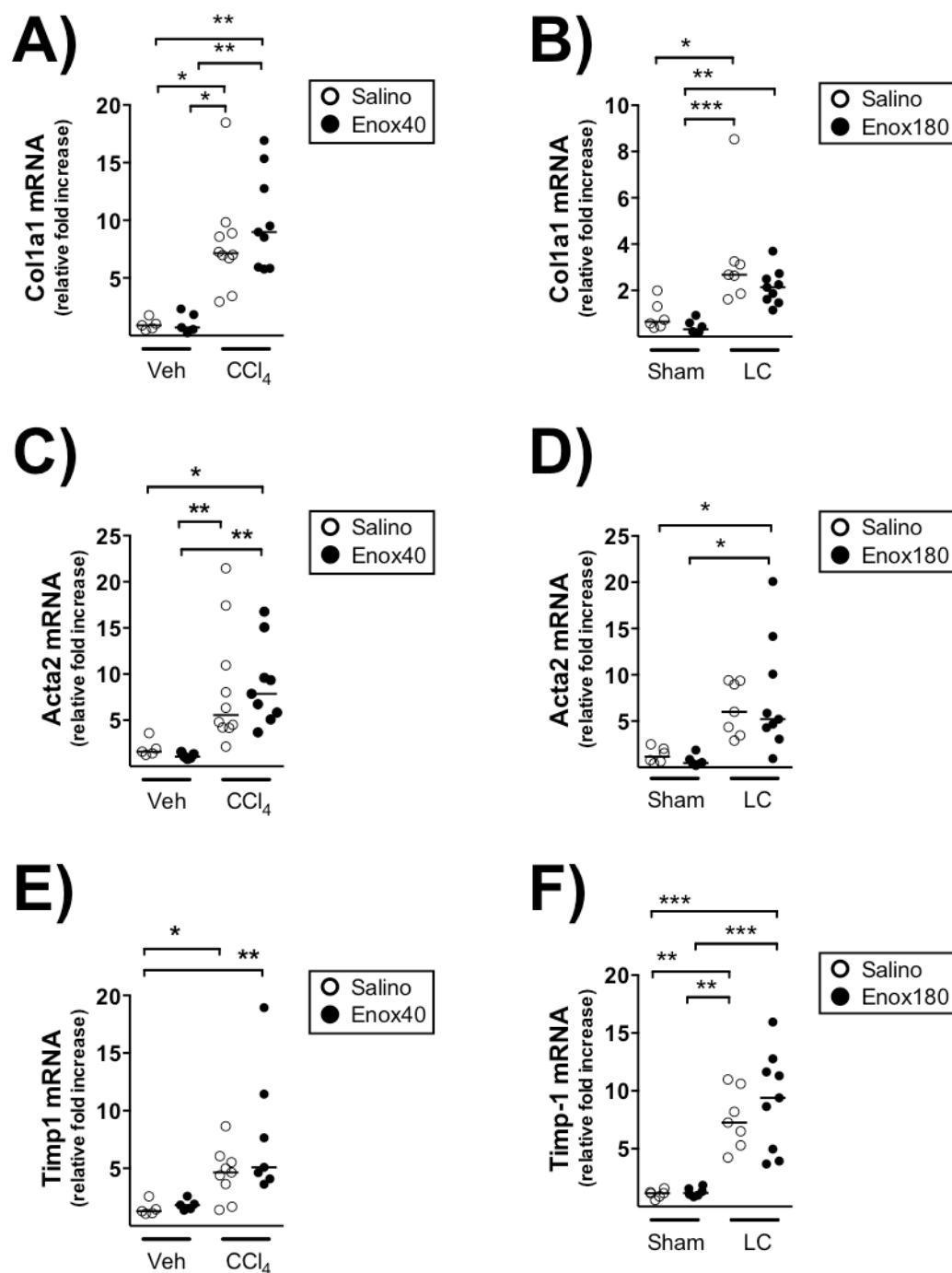


Figura 18. Expresión de RNAm de los genes *Col1a1* (colágeno tipo 1), *Acta 2* (alpha-smooth muscle actin) y *Timp-1* (tissue inhibitor of metalloproteinases-1) en tejido hepático procedente de ratas de los grupos control (Veh) y cirrótico (CCl₄) tratadas con salino o con 40 UI/kg/24h de enoxaparina en el modelo experimental de CCl₄ oral (A, C, E), y de ratas de los grupos control (Sham) y cirrótico (LC) tratadas con 180 UI/kg/24h de enoxaparina en el modelo de cirrosis biliar inducida por ligadura del colédoco (LC) (B, D, F). Cada símbolo representa los valores individuales de cada rata y la línea horizontal la mediana de cada grupo.

* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$.

Abreviaturas: Veh: vehículo; CCl₄: tetracloruro de carbono; Enox180: enoxaparina 180 UI/kg/24h.

Parámetros cardio-respiratorios

Ni el desarrollo de cirrosis ni el tratamiento con enoxaparina tuvieron una influencia importante en parámetros cardio-respiratorios como la frecuencia cardíaca, la presión arterial media o la frecuencia respiratoria en ninguno de los 2 modelos experimentales, si bien existió una tendencia no significativa de los grupos de ratas con cirrosis a presentar valores menores de presión arterial media (ver **Tabla 16**).

Tabla 16. Parámetros cardio-respiratorios.

	Modelo de cirrosis por CCl ₄ [#]				Modelo de cirrosis por LC [#]			
	Veh-Sal	Veh-Enox40	CCl ₄ -Sal	CCl ₄ -Enox40	Sham-Sal	Sham-Enox180	LC-Sal	LC-Enox180
FC (lpm)	315±30	315±17	317±36	277±22	311±20	337±16	311±14	312±51
PAM (mm Hg)	98,3±18,6	101,6±12,5	88,5±8,8	84,1±10,4	81,4±4,3	88±18,3	77±14,5	65,6±19,5
FR (rpm)	58±9	45±7	53±7	55±9	56±14	49±5	51±11	41±11

Los valores se expresan como media ± SD o mediana (rango).

No se disponen de datos hemodinámicos en 3 ratas de cada grupo tratado con CCl₄, en 4 del grupo LC-Enox180, y en 3 del grupo Sham-Enox180, debido a un error técnico.

Abreviaturas: FC: frecuencia cardíaca, FR: frecuencia respiratoria, lpm: latidos por minuto, rpm: respiraciones por minuto.

Desarrollo de hipertensión portal y ascitis

En el modelo de cirrosis inducida por administración de CCl₄, todas las ratas que recibieron CCl₄ desarrollaron importantes elevaciones de la presión portal evaluada por medición directa en la vena ileo-cólica (**Veh-Sal**: 6,0±1,4 mmHg vs. **Veh-Enox40**: 6,4±1,4 mmHg vs. **CCl₄-Sal**: 14,5±2,7 mmHg vs. **CCl₄-Enox40**: 13,6±2,9 mmHg, **Figura 19.A**) así como una importante esplenomegalia, evaluada por la relación “peso del bazo/peso corporal” (**Veh-Sal**: 0,17±0,02 vs. **Veh-Enox40**: 0,16±0,02 vs. **CCl₄-Sal**: 0,4±0,1 vs. **CCl₄-Enox40**: 0,46±0,1, **Figura 19.B**). La administración de enoxaparina no tuvo influencia alguna en ninguno de estos parámetros (**Figura 19.A,B**). En consonancia con estos resultados, la enoxaparina tampoco redujo el porcentaje de ratas que desarrollaron ascitis (**Veh-Sal**: 0% vs. **Veh-Enox40**: 0% vs. **CCl₄-Sal**: 80% vs. **CCl₄-Enox40**: 100%, $p < 0,01$ grupos **CCl₄** vs. grupos **Veh**).

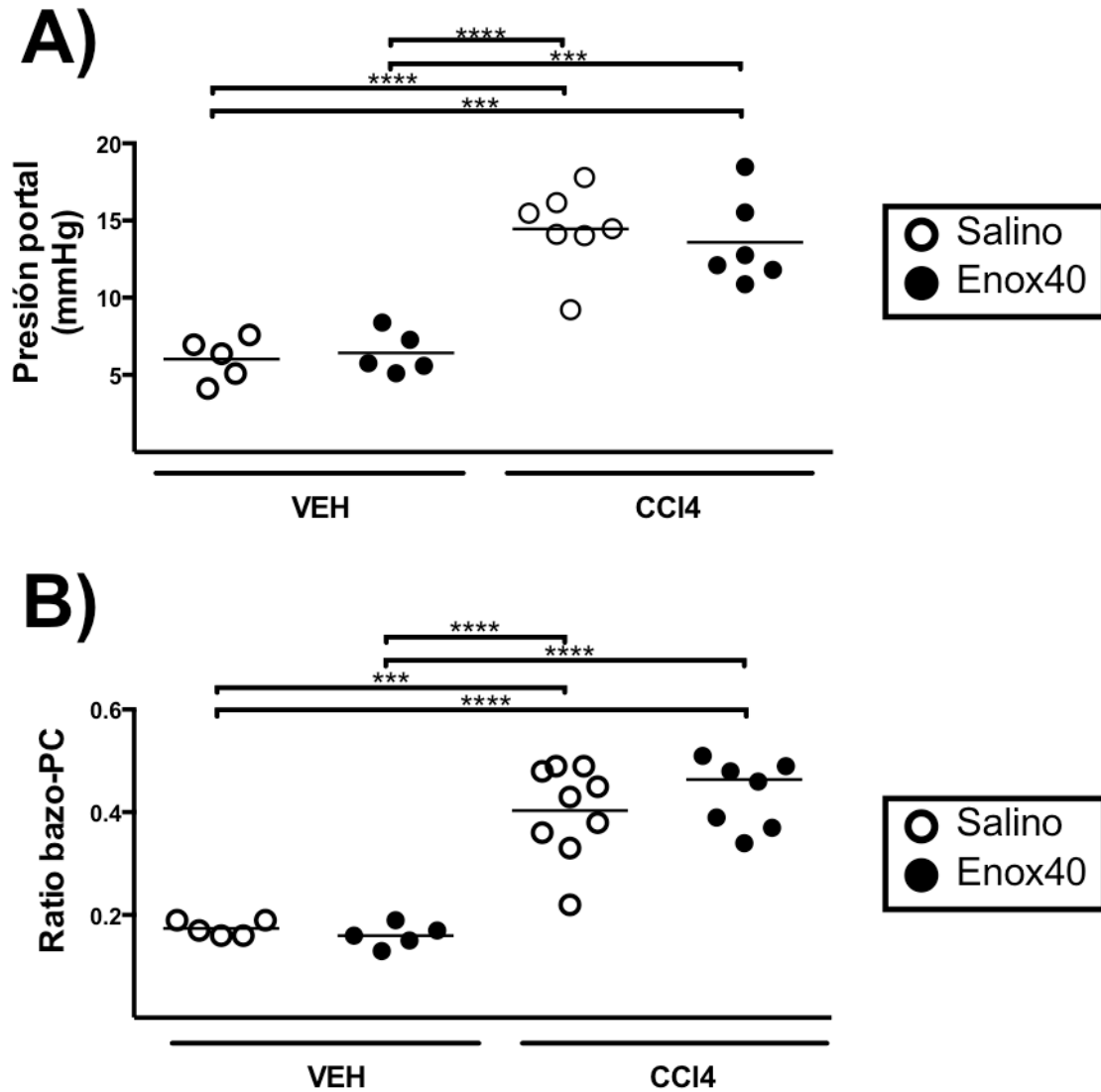


Figura 19: Presión portal (A) y ratio “peso del bazo/peso corporal” (B) en ratas con cirrosis hepática inducida por la administración oral de tetracloruro de carbono (CCl₄). Cada símbolo representa los valores individuales de cada rata y la línea horizontal la mediana de cada grupo.

*** = $p < 0,001$; **** = $p < 0,0001$.

Abreviaturas: PC: peso corporal; VEH: vehículo; Enox40: enoxaparina 40 UI/kg/24h.

El modelo de cirrosis inducida por la LC mostró alteraciones similares, con una consistente ausencia de efecto beneficioso del tratamiento con enoxaparina sobre la elevación de la presión portal (**Sham-Sal**: $5,3 \pm 0,9$ mmHg vs. **Sham-Enox180**: $7,7 \pm 0,8$ mmHg vs. **LC-Sal**: $12,0 \pm 2,2$ mmHg vs. **LC-Enox180**: $15,3 \pm 1,6$ mmHg, **Figura 20.A**) y sobre el desarrollo de esplenomegalia (**Sham-Sal**: $0,2 \pm 0,01$ vs. **Sham-Enox180**: $0,18 \pm 0,02$ vs. **LC-Sal**: $0,74 \pm 0,05$ vs. **LC-Enox180**: $0,72 \pm 0,22$, **Figura 20.B**) observados en los grupos de ratas con LC. Por el contrario, la elevación de la presión portal incluso fue mayor en las ratas con LC tratadas con enoxaparina que en las tratadas con salino ($p = 0,02$, **Figura 20.A**). El porcentaje de ratas que desarrollaron ascitis, aunque menor que en el modelo de administración de CCl₄, tampoco fue influido por la administración de enoxaparina (**Sham-Sal**: 0% vs. **Sham-Enox180**: 0% vs. **LC-Sal**: 14,3% vs. **LC-Enox180**: 22,2%, $p < 0,01$ grupos **LC** vs. grupos **Sham**).

Translocación bacteriana y respuesta inflamatoria sistémica

El tratamiento con enoxaparina no redujo la incidencia de peritonitis bacteriana espontánea ni afectó la respuesta inflamatoria sistémica, evaluada por los niveles circulantes de IL-6, en ninguno de los modelos experimentales estudiados.

Entre las ratas que desarrollaron ascitis en el modelo de administración oral de CCl₄, la frecuencia de cultivos positivos del líquido ascítico fue similar en el grupo **CCl₄-Sal** que en el grupo **CCl₄-Enox40**: 2 de 7 (28,6%) vs. 4 de 8 (50%), $p = 0,61$ (test exacto de Fisher). Ambos grupos presentaron también niveles similares de IL-6 circulante (**CCl₄-Sal**: 349 ± 138 pg/mL vs. **CCl₄-Enox40**: 248 ± 66 pg/mL, $p = 0,89$; Prueba U de Mann-Whitney).

Entre las ratas que desarrollaron ascitis en el modelo de cirrosis hepática inducida por LC, la frecuencia de cultivos positivos del líquido ascítico fue algo menor que en el modelo por CCl₄, pero también similar entre el grupo **LC-Sal** y el grupo **LC-Enox180**: 1 de 6 (16,7%) vs. 2 de 7 (28,6%), $p = 1,0$ (test exacto de Fisher). Los niveles de IL-6 circulantes también fueron similares en estos grupos, independientemente del tratamiento con enoxaparina (**LC-Sal**: 278 ± 103 pg/mL vs. **LC-Enox180**: 370 ± 168 pg/mL, $p = 0,94$; Prueba U de Mann-Whitney).

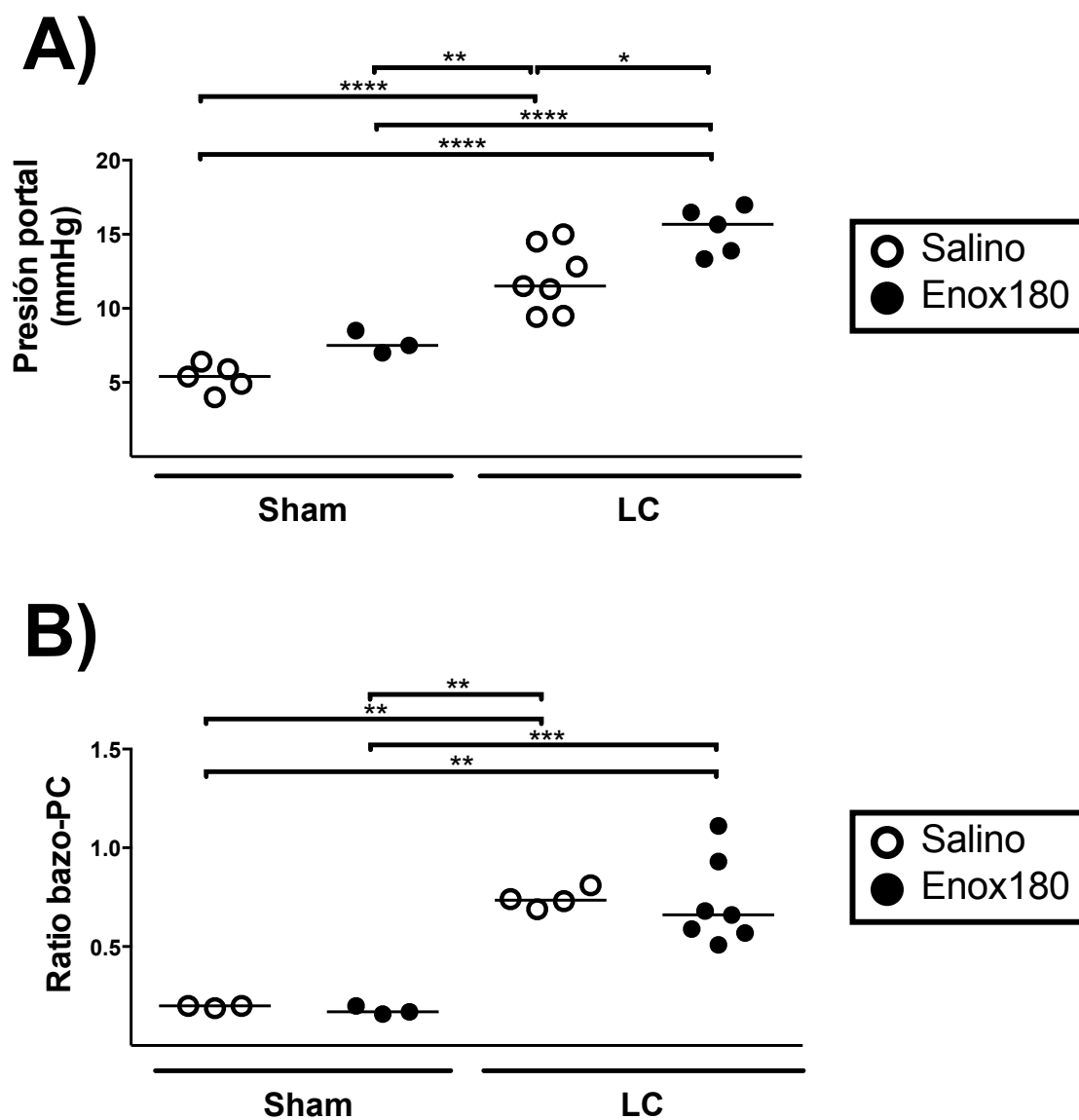


Figura 20: Presión portal (A) y ratio “peso del bazo/peso corporal” (B) en ratas con cirrosis biliar inducida por la ligadura del colédoco (LC). Cada símbolo representa los valores individuales de cada rata y la línea horizontal la mediana de cada grupo.

* = p<0,05; ** = p<0,01; *** = p<0,001; **** = p<0,0001.

Abreviaturas: PC: peso corporal; VEH: vehículo; Enox180: enoxaparina 180 UI/kg/24h.

9.2.2. Objetivo II.B: Evaluación de los efectos de la enoxaparina sobre la disfunción endotelial evaluada en estudios de perfusión hepática bivascular ex-vivo en ratas con cirrosis hepática inducida por inhalación de CCl₄.

Efectos de la enoxaparina sobre la modulación del tono vascular del lecho portal

En un primer experimento, evaluamos la vasodilatación del lecho vascular portal en respuesta a la perfusión de los hígados con dosis crecientes de acetilcolina (evalúa vasodilatación por NO dependiente del endotelio) o de SNAP (evalúa vasodilatación por NO independiente del endotelio) en ratas con cirrosis hepática inducida por CCl₄ inhalado. El tratamiento con enoxaparina no influyó en la disfunción del lecho vascular portal, ya que tanto las ratas del grupo CCl₄-Sal como las del CCl₄-Enox40 presentaron la falta de respuesta vasodilatadora característica de la cirrosis, ilustrada por la falta de caída de la resistencia vascular portal y sinusoidal ante la exposición a acetilcolina (**Figura 21.A,B**) y por la discreta caída de ambas ante la exposición a SNAP (**Figura 21.C,D**). Los cambios absolutos tanto en la resistencia vascular portal como en la resistencia sinusoidal no fueron diferentes entre los grupos.

Dados estos resultados iniciales, realizamos experimentos adicionales con una dosis más alta de enoxaparina (180 UI/Kg/24 h) administrada desde el comienzo de la exposición al CCl₄ en lugar de a las 8 semanas con el objetivo de maximizar la posibilidad de detectar efectos de la enoxaparina. En estos experimentos, y al contrario de lo esperado, el tratamiento con enoxaparina empeoró la respuesta vasodilatadora del lecho vascular portal, asociándose a unos valores más elevados de la resistencia vascular portal y de la resistencia sinusoidal en los experimentos con acetilcolina (**Figura 22.A,B**) y, de forma más evidente, en los experimentos con SNAP (**Figura 22.C,D**). Al igual que en el primer experimento, los cambios absolutos de la resistencia vascular portal y de la resistencia sinusoidal fueron similares en las ratas con y sin tratamiento con enoxaparina.

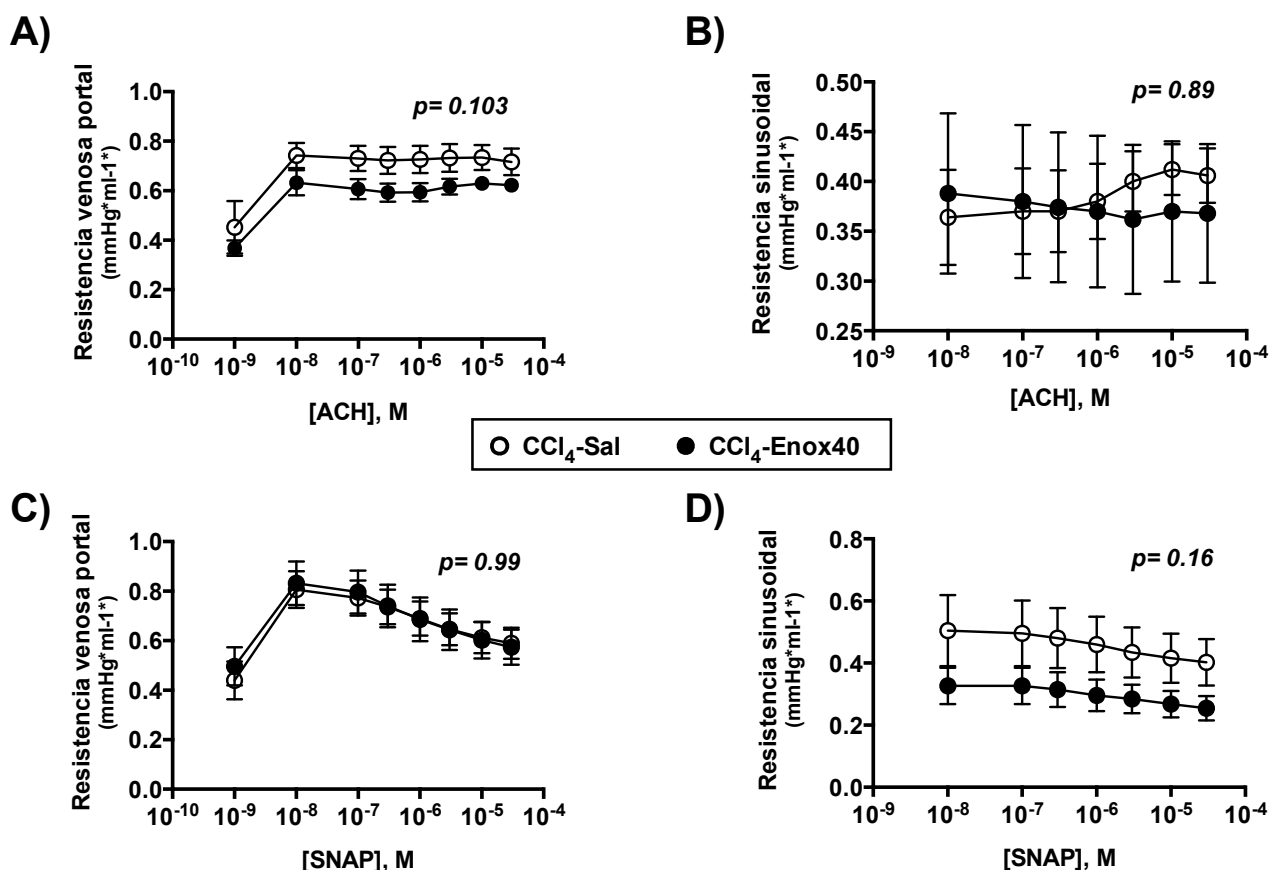


Figura 21. Curvas de dosis-respuesta de la resistencia venosa portal (A y C) y de la resistencia sinusoidal (B y D) en respuesta a la administración de acetilcolina (ACH, vasodilatación dependiente del endotelio) y SNAP (vasodilatación independiente del endotelio) en ratas con cirrosis inducida por la administración de tetracloruro de carbono (CCl₄) tratadas con enoxaparina (CCl₄-Enox40, círculos con relleno) o salino (CCl₄-Sal, círculos sin relleno) a partir de la octava semana de administración de CCl₄ inhalado. Cada círculo con sus barras representa la media y desviación estándar de cada grupo a distintas dosis de acetilcolina y SNAP.

Abreviaturas: SNAP: S-Nitroso-N-Acetilpenicilamina); M: molar; Enox40: enoxaparina 40 UI/kg/24h.

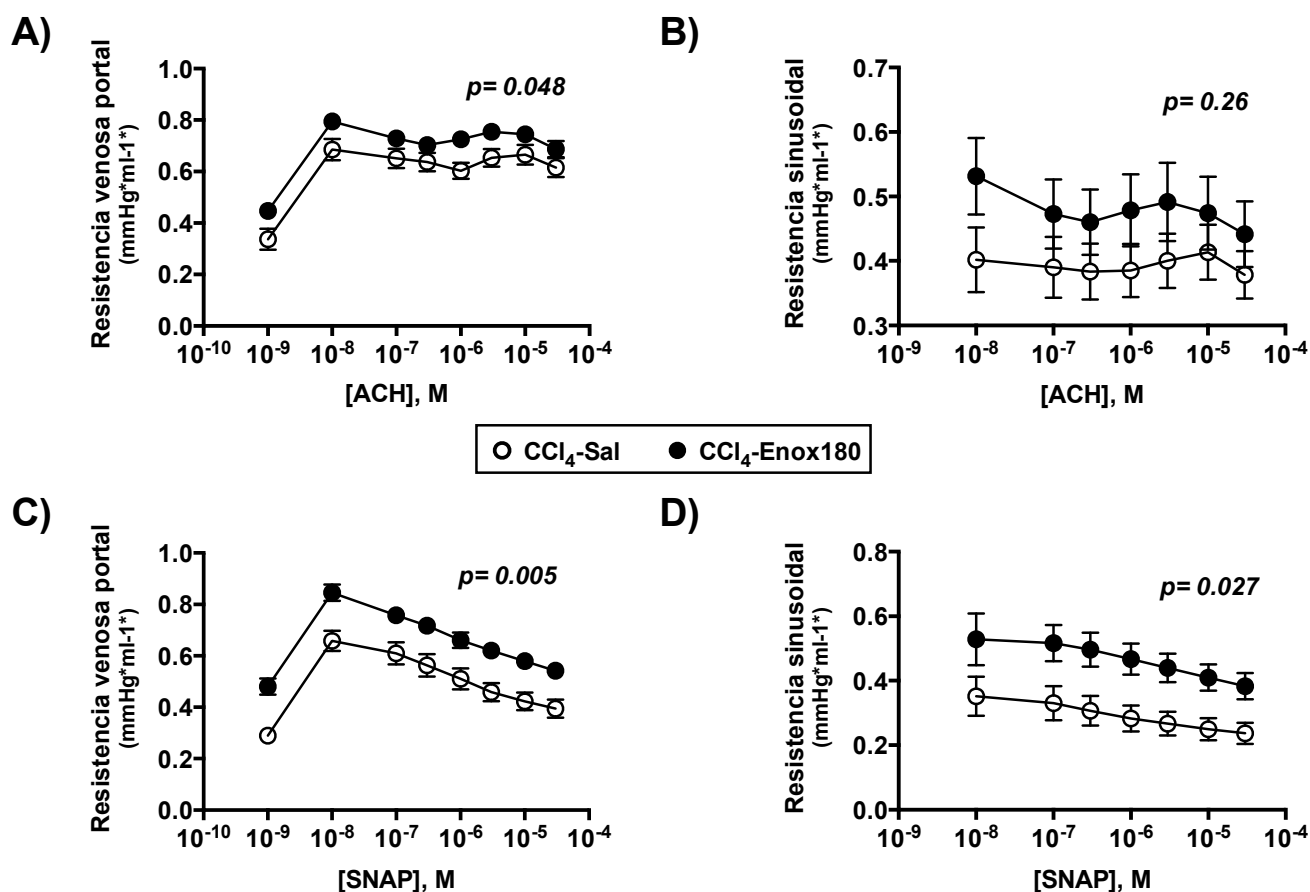


Figura 22. Curvas de dosis-respuesta de la resistencia venosa portal (A y C) y de la resistencia sinusoidal (B y D) en respuesta a dosis progresivas de acetilcolina (ACH, vasodilatación dependiente del endotelio) y SNAP (vasodilatación independiente del endotelio) en ratas con cirrosis inducida por la administración de tetracloruro de carbono (CCl₄) tratadas con enoxaparina (CCl₄-Enox180, círculos con relleno) o salino (CCl₄-Sal, círculos sin relleno) desde el inicio de la administración de CCl₄ inhalado. Cada círculo con sus barras representa la media y desviación estándar de cada grupo a distintas dosis de acetilcolina y SNAP.

Abreviaturas: SNAP: S-Nitroso-N-Acetilpenicilamina); M: molar; Enox180: enoxaparina 180 UI/kg/24 h.

Efectos de la enoxaparina sobre la modulación del tono vascular de la arteria hepática

Los experimentos de perfusión bi-vascular de hígado aislado ex-vivo permitieron también el estudio detallado de posibles efectos de la enoxaparina sobre las alteraciones de la reactividad de la arteria hepática características de la cirrosis. Para ello, evaluamos la respuesta vasoconstrictora de la arteria hepática durante la administración de dosis crecientes de un vasoconstrictor (la metoxamina) en ausencia o presencia de un inhibidor de la síntesis de óxido nítrico (el L-NMMA).

En los experimentos realizados en ratas con administración de enoxaparina a dosis bajas (40 UI/Kg/24 h) desde la semana 8 tras el inicio de la exposición a CCl₄, la perfusión con dosis crecientes de metoxamina en ausencia de L-NMMA indujo una elevación de la resistencia de la arteria hepática que fue similar en todas las ratas, independientemente de la administración o no de enoxaparina (**Figura 23.A**). Más aún, la administración de enoxaparina tampoco tuvo ninguna influencia ni en la elevación de la resistencia arterial hepática inducida por la exposición a L-NMMA ni en las curvas de respuesta de dicho parámetro a dosis crecientes de metoxamina en presencia de L-NMMA ($p=0,16$, **Figura 23.A**).

En los experimentos realizados en ratas con administración de enoxaparina a dosis altas (180 UI/Kg/24 h) desde el inicio de la exposición a CCl₄, la perfusión con dosis crecientes de metoxamina en ausencia de L-NMMA indujo una elevación de la resistencia arterial hepática que fue mayor en las ratas tratadas con enoxaparina que en aquellas tratadas con salino ($p=0,025$, **Figura 23.B**). En presencia de L-NMMA, sin embargo, la exposición a dosis crecientes de metoxamina indujo elevaciones de la resistencia arterial hepática que fueron similares independientemente de la administración o no de enoxaparina ($p=0,67$, **Figura 23.B**).

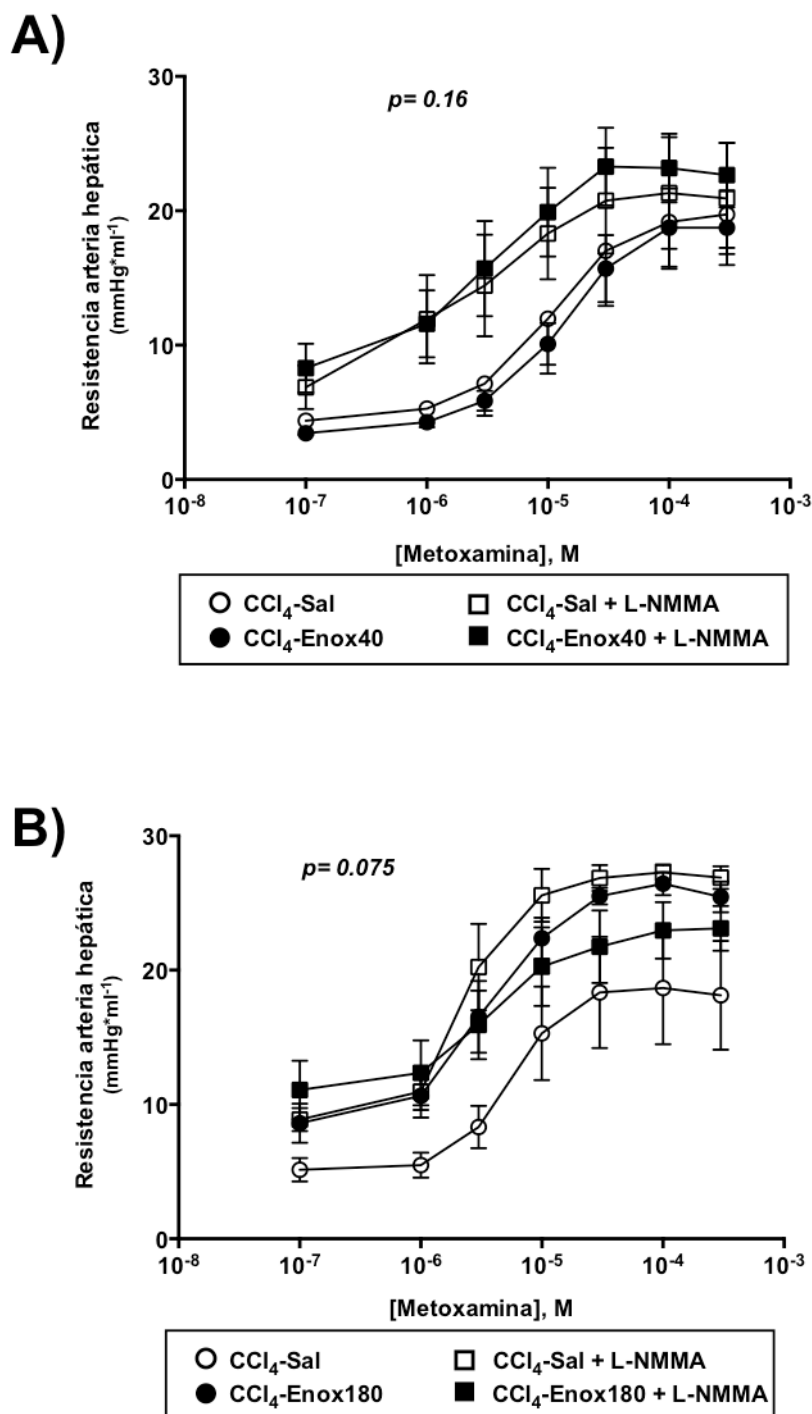


Figura 23. Curvas de dosis-respuesta de la resistencia arterial hepática en respuesta a la administración de dosis crecientes de metoxamina (agonista α_1) en presencia (cuadrados) o ausencia (círculos) de L-NMMA (inhibidor de la producción de óxido nítrico) en ratas con cirrosis inducida por la administración de tetracloruro de carbono (CCl₄) tratadas con enoxaparina (CCl₄-Enox180, símbolos con relleno) o salino (CCl₄-Sal, símbolos sin relleno) a partir de la octava semana de administración de CCl₄ inhalado (A) o desde el inicio de su administración (B). Cada símbolo con sus barras representa la media y desviación estándar de cada grupo a distintas dosis de metoxamina.

Abreviaturas: L-NMMA: NG-monometil-L-arginina; M: molar; Enox40: enoxaparina 40 UI/kg/24h; Enox180: enoxaparina 180 UI/kg/24h.

10. DISCUSIÓN

Estudios clínicos y experimentales recientes sugieren que el tratamiento con heparinas de bajo peso molecular, principalmente con enoxaparina, puede ser una opción terapéutica valiosa en pacientes con enfermedad hepática para reducir la progresión de la fibrosis hepática, la hipertensión portal y sus complicaciones clínicas asociadas. En el presente trabajo, utilizamos una variedad de modelos experimentales de cirrosis hepática y de protocolos de administración de enoxaparina (tanto diferentes dosis como duración) con el fin de evaluar exhaustivamente si el tratamiento a largo plazo con enoxaparina en la enfermedad hepática avanzada es capaz de atenuar la progresión de la fibrosis hepática y de reducir la hipertensión portal y sus complicaciones. Desgraciadamente, no observamos efecto beneficioso alguno de la enoxaparina sobre la fibrosis hepática o la presión portal en ninguno de los modelos experimentales examinados. Asimismo, tampoco observamos ningún efecto beneficioso de la enoxaparina sobre la disfunción endotelial o sobre las alteraciones de la circulación microvascular intrahepática portal o arterial, evaluadas en experimentos ex-vivo de perfusión hepática bi-vascular. Además, en los estudios preliminares caracterizamos y optimizamos tanto un nuevo modelo experimental de cirrosis hepática inducida por la administración intragástrica de CCl₄ dos veces por semana como un régimen anestésico con sevoflurano inhalado para la realización de mediciones hemodinámicas en ratas normales o con hipertensión portal.

Así, siguiendo los **OBJETIVOS** enunciados en la página 51, las tres preguntas centrales respondidas por nuestro trabajo son las siguientes:

I. ¿ES POSIBLE MEJORAR LA REPRODUCIBILIDAD DEL MODELO DE CIRROSIS HEPÁTICA INDUCIDA POR LA ADMINISTRACIÓN ORAL DE CCL₄?

La utilización de un modelo experimental que sea lo más reproducible posible es una parte crucial de cualquier diseño experimental, particularmente si se persigue evaluar los efectos de una manipulación específica terapéutica o no terapéutica. Además de su reproducibilidad y especificidad, la elección de un determinado modelo animal debe tener en cuenta otras consideraciones más específicas como la especie o

el aspecto fisiopatológico concreto que se quiere investigar (**Tablas 2 y 3**), ya que el número de especies comúnmente utilizadas es limitado y ningún modelo reproduce todas las facetas de la enfermedad en humanos (93, 95).

El CCl₄ es la hepatotoxina más utilizada para inducir cirrosis hepática en el animal experimental, y la administración repetida de CCl₄ es uno de los modelos experimentales más empleados para estudiar la patogénesis de la fibrosis y cirrosis hepática y de la hipertensión portal (93, 101, 102, 107, 108, 121). El modelo de cirrosis hepática inducida por CCl₄ tiene considerables ventajas, ya que es un modelo poco costoso y fácilmente realizable. El CCl₄ tiene además mínimos efectos tóxicos extra-hepáticos, y se ha utilizado con éxito en varias especies (ratas, ratones, conejos). En comparación con el resto de modelos experimentales de cirrosis, la administración de CCl₄ tiene además la importante característica de que las alteraciones hepáticas arquitecturales y hemodinámicas que produce son tremendamente similares a las observadas en la cirrosis hepática en humanos. Es esta última cualidad la que hace de la administración de CCl₄ el modelo de cirrosis preferido para muchos investigadores.

A pesar de sus innegables ventajas, el modelo de cirrosis inducido por CCl₄ dista de ser un modelo ideal. La duodécima edición del informe sobre carcinógenos incluyó al CCl₄ como probable carcinógeno en base a la evidencia procedente de estudios de experimentación animal (119). Así, es importante y necesario que el personal investigador use medidas de protección durante la manipulación del CCl₄ o de los animales para evitar no solo su toxicidad hepática, sino también su potencial carcinogenicidad (**Tabla 5**) (141). Otros inconvenientes de los protocolos de administración del CCl₄ actuales son la larga duración requerida para desarrollar ascitis y la alta mortalidad. La principal desventaja de los modelos de cirrosis hepática inducidos por CCl₄, sin embargo, radica en la diferente sensibilidad individual de cada rata al daño inducido por el CCl₄ (93, 142), lo cual resulta en una baja reproducibilidad tanto en el desarrollo de fibrosis hepática como de hipertensión portal o ascitis, incluso en un mismo centro o grupo investigador. Dado que nuestra intención era evaluar el efecto de la enoxaparina en estos parámetros, consideramos que era

importante tratar de optimizar la reproducibilidad de este modelo antes de realizar nuestro estudio.

Desde la descripción de las propiedades hepatotóxicas del CCl₄, son varias las modificaciones e intentos que se han realizado para aumentar la reproducibilidad del modelo y tratar de obtener grupos homogéneos de ratas con cirrosis, como por ejemplo la utilización de fenobarbital y otros inductores del CYP2E1 para potenciar la toxicidad del CCl₄. En 1982, Proctor y Chatamra propusieron otra solución que consistía en individualizar la dosis en función de la ganancia o pérdida de peso corporal producida tras la administración de la dosis de CCl₄ previa. Utilizando dicho protocolo, el 74 % de las ratas desarrollaron ascitis tras 8-10 semanas de administración orogástrica de CCl₄ con una periodicidad semanal (124). Sin embargo, su estudio no comunicó la mortalidad asociada ni las variaciones en el peso corporal para ajustar la dosis del CCl₄. Desde entonces, se han diseñado varias modificaciones de este protocolo y otros nuevos protocolos utilizando CCl₄ por vía orogástrica con resultados variables en términos de tiempo necesario para el desarrollo de ascitis o de mortalidad asociada (**Tabla 6**).

Uno de los protocolos de inducción de cirrosis hepática por CCl₄ más utilizado en la actualidad es el diseñado por Runyon *et al*, basado en la administración semanal orogástrica de CCl₄ con ajuste de dosis en función de la variación de peso corporal, y que consigue que la mayor parte de las ratas desarrollen una cirrosis hepática descompensada. Los mayores inconvenientes del protocolo de Runyon *et al* son su elevada mortalidad (30-58%) y su larga y variable duración, ya que generalmente se requieren entre 10 y 20 semanas hasta el desarrollo de ascitis (148-153). Más recientemente, Regimbeau *et al* diseñaron dos protocolos de inducción de cirrosis hepática en los que la administración de CCl₄ por vía orogástrica se realizaba cada 4 días durante 6 semanas ("*protocolo rápido*") o cada 6 días durante 9 semanas ("*protocolo lento*"), con un ajuste de dosis específico también en función de los cambios en el peso corporal. Con el "*protocolo rápido*", el 100 % de las ratas desarrollaron una cirrosis micronodular y el 60 % desarrollaron ascitis, siendo la

mortalidad asociada del 30 % (129). A pesar de las aparentes ventajas del protocolo de Regimbeau *et al*, no conocemos otros estudios en la literatura en los que se haya utilizado su protocolo ni una comparación en paralelo entre ambos.

Con el objeto de elegir el protocolo más reproducible para estudiar posteriormente los posibles efectos de la enoxaparina sobre la cirrosis, realizamos una comparación en paralelo entre el protocolo original de Runyon (administración orogástrica de CCl₄ una vez por semana) y el protocolo rápido de Regimbeau en el que introdujimos una ligera modificación (administración orogástrica de CCl₄ los lunes y viernes en lugar de cada 4 días). A pesar de que la dosis global de CCl₄ utilizada fue similar en ambos protocolos, los resultados de nuestro trabajo indican que el protocolo de Regimbeau modificado (**CCl₄-[2xSem]**) es superior al protocolo de Runyon (**CCl₄-[1xSem]**) en el desarrollo de fibrosis hepática e hipertensión portal a las 12 semanas de tratamiento, sin asociar una mayor mortalidad:

1) Desarrollo de fibrosis hepática y disfunción hepatocelular.

Si bien los dos protocolos resultaron en el desarrollo de una cirrosis hepática con presencia de nódulos de regeneración separados por gruesos tabiques fibrosis porto-portales y/o centro-portales, el protocolo de Regimbeau (CCl₄-[2xSem]) modificado indujo un grado de fibrosis ostensiblemente mayor. Aunque las escalas tradicionales semicuantitativas, como la escala de Ishak, no permiten diferenciar la gravedad y pronóstico de los pacientes con las alteraciones arquitecturales que definen la cirrosis, ya que ésta constituye el último estadio histológico, el grado de fibrosis presente en la cirrosis es importante. Así, la cuantificación de la fibrosis en muestras de hígado humanas (la denominada área proporcional de colágeno) fue el único parámetro histológico que predijo de forma independiente la aparición de una descompensación de la enfermedad hepática en un estudio realizado por Tsochatzis *et al* (194). Por lo tanto, el mayor grado de fibrosis desarrollado con el protocolo de Regimbeau modificado apoya la existencia de un mayor daño hepático que el conseguido por el protocolo de Runyon. En consonancia con estos datos, las ratas que siguieron el

protocolo de Regimbeau modificado tuvieron una alteración más marcada de los parámetros analíticos de función hepática y una mayor atrofia hepática que las que siguieron el protocolo de Runyon. En estudios previos en ratas tratadas con CCl₄, el grado de atrofia hepática ha sido descrito como un signo de enfermedad hepática más avanzada (124, 126).

2) Desarrollo de hipertensión portal y ascitis.

Los dos protocolos de administración orogástrica de CCl₄ evaluados resultaron en un aumento de presión portal y en esplenomegalia comparados con el grupo de ratas controles, indicando que ambos protocolos indujeron el desarrollo de hipertensión portal. Al igual que en el caso de la fibrosis, las ratas que siguieron el protocolo de Regimbeau modificado (**CCl₄-[2xSem]**) desarrollaron ascitis más frecuentemente, y tuvieron una presión portal significativamente más elevada y una esplenomegalia más marcada que aquellas que siguieron el protocolo de Runyon (**CCl₄-[1xSem]**). La alta frecuencia de ascitis (80%) encontrada en las ratas que siguieron el protocolo de Regimbeau modificado pone de manifiesto la consistencia y reproducibilidad de dicho protocolo, y contrasta con el bajo porcentaje de ascitis (10 %) obtenido con el protocolo de Runyon. Un resultado similar con este último protocolo ha sido comunicado por Úbeda *et al*, ya que observaron que todas las ratas desarrollaron una cirrosis hepática después de 12 semanas, pero ninguna de ellas presentó ascitis (153). Por el contrario, Guarner *et al* comunicaron un porcentaje de ascitis del 95 % tras una media de 10 semanas de administración de CCl₄ (SD 2,1) utilizando el mismo protocolo (150). Estos estudios, por tanto, apoyan la baja reproducibilidad del protocolo de Runyon. En este sentido, parece esencial la necesidad por parte de cada laboratorio de probar cada modelo antes de su utilización en estudios experimentales, ya que su eficacia puede estar condicionada por factores como el tipo de estabulación o la climatización propia de cada centro de investigación.

3) Mortalidad.

Pese a la mayor periodicidad de administración del CCl₄ en el protocolo de Regimbeau modificado (dos veces por semana vs. una vez por semana), la dosis global de CCl₄ recibida por cada rata fue similar en ambos protocolos y no hubo diferencias significativas en la mortalidad entre ellos. La mortalidad asociada a la administración de CCl₄ generalmente se atribuye al daño hepático agudo producido por el mismo (124, 149). La aparente tendencia a una mayor mortalidad en el protocolo de Regimbeau modificado comparado con el de Runyon (**CCl₄-[2xSem]**: 33% vs. **CCl₄-[1xSem]**: 17%, $p = 0,41$) no puede ser atribuida a este motivo, puesto que 3 de las 5 ratas en el protocolo de Regimbeau modificado lo hicieron como consecuencia de una inyección accidental del CCl₄ en la vía respiratoria. Sí es lógico pensar que la administración del CCl₄ dos veces por semana en dicho protocolo favorezca ese tipo de error.

Idealmente, nuestro estudio podría haber incluido en la comparación en paralelo un tercer protocolo consistente en la administración de CCl₄ por vía inhalatoria. Dicha ruta de administración es una de las más utilizadas actualmente, y son escasos los estudios que hayan comparado la eficacia en inducir cirrosis hepática en función de la vía de administración del CCl₄. La administración de CCl₄ por vía inhalatoria, sin embargo, requiere de una mayor infraestructura, la cual no estaba disponible en nuestro centro durante la realización del estudio. En cualquier caso, los resultados de nuestro trabajo indican que el protocolo de Regimbeau modificado es un método rápido y reproducible de inducir cirrosis hepática e hipertensión portal avanzadas, haciéndolo el protocolo de administración orogástrica de CCl₄ más atractivo para estudiar posibles efectos de intervenciones terapéuticas como la enoxaparina.

II. ¿ES LA ANESTESIA CON SEVOFLURANO MEJOR QUE LA COMBINACIÓN DE KETAMINA+DIAZEPAM PARA LA REALIZACIÓN DE ESTUDIOS HEMODINÁMICOS EN RATAS NORMALES O CON HIPERTENSIÓN PORTAL?

El régimen anestésico ideal en estudios experimentales de hipertensión portal debería cumplir una serie de requisitos generales (aplicables a cualquier modelo de enfermedad) y otros requisitos específicos para este síndrome, entre ellos: 1) su dosificación debe ser fácilmente ajustable para evitar episodios de inestabilidad hemodinámica u otras complicaciones derivadas de la sobredosificación anestésica, 2) su uso debe ser compatible con el equipamiento disponible en el laboratorio, 3) debe emplear fármacos no hepatotóxicos y sin metabolismo hepático para evitar un agravamiento de la enfermedad hepática y que ésta pueda interferir con su farmacocinética, y 4) el régimen anestésico no debe tener efectos (o al menos mínimos efectos) sobre la hemodinámica sistémica y esplácnica característica del síndrome de hipertensión portal (163, 186).

La anestesia con ketamina, generalmente asociada a diazepam, es el régimen anestésico más frecuentemente utilizado en la literatura para la medición de la hemodinámica sistémica y de la presión portal en roedores. La anestesia con Ketamina+Diazepam tiene como principales ventajas que no requiere apenas equipamiento y que su manipulación no es peligrosa para el investigador. Sin embargo, tanto la ketamina como el diazepam tienen metabolismo hepático y el nivel de la anestesia es poco controlable debido a su variable absorción y sensibilidad individual a los mismos (169, 195). Además, su administración en este tipo de estudios se suele hacer por vía intramuscular en lugar de intraperitoneal para que no afecte la reactividad vascular esplácnica, sobrepasando generalmente los límites de volumen que son aceptados para dicha vía y haciendo su absorción más errática aún. Frente a la combinación Ketamina+Diazepam, la anestesia con sevoflurano ofrece una inducción mucho más rápida de la anestesia, y un control más rápido y preciso de la profundidad de la misma. Otra importante ventaja del sevoflurano es que se elimina principalmente por vía respiratoria sin apenas ser metabolizado por el hígado (<5 %) (196). Las

principales desventajas de la anestesia con sevoflurano son derivadas de la necesidad de un equipamiento más complejo y costoso, y de la potencial toxicidad al personal investigador en caso de no utilizar un equipo adecuado (197).

Dadas las importantes ventajas que la anestesia con sevoflurano tiene a priori frente a la anestesia con Ketamina+Diazepam, decidimos realizar una comparación en paralelo de ambos regímenes anestésicos con dos fines principales: 1) confirmar las ventajas de la anestesia con sevoflurano, y 2) validar la anestesia con sevoflurano para la realización de mediciones hemodinámicas en estudios de enfermedad hepática e hipertensión portal. Para ello, utilizamos un modelo de hipertensión portal inducido por la LPVP, el cual es más fácil, rápido y reproducible respecto a la inducción de hipertensión portal que los modelos experimentales de cirrosis hepática. El desarrollo de hipertensión portal, esplenomegalia y atrofia hepática observadas en las ratas con LPVP en nuestro trabajo apoyan la validez del modelo, aunque los cambios en el peso hepático tras esta cirugía pueden ser muy variables (103).

Los resultados de nuestro trabajo sugieren que la anestesia con sevoflurano es superior a la anestesia con Ketamina+Diazepam en términos de control y estabilidad del plano anestésico, de disminución de la mortalidad relacionada con la anestesia, y de cumplimiento de las guías de administración, sin que dichas ventajas interfieran con las mediciones de parámetros hemodinámicos sistémicos y hepáticos que son objeto de estudio. Así, los principales aspectos que se evaluaron fueron los siguientes:

1) Estabilidad de la anestesia.

Tanto la anestesia con sevoflurano como la combinación de ketamina+diazepam lograron una adecuada profundidad anestésica en ratas normales y en ratas con hipertensión portal inducida por LPVP. Sin embargo, las ratas anestesiadas con Ketamina+Diazepam, tanto normales como con hipertensión portal, presentaron una mayor variabilidad de su sensibilidad individual, requiriendo algunas ratas dosis adicionales de ketamina mientras que otras permanecieron adecuadamente

anestesiadas a lo largo de todo el estudio con la dosis inicial. La mayor variabilidad de la frecuencia respiratoria en las ratas anestesiadas con la combinación Ketamina+Diazepam también sugiere que el plano anestésico podría haber sido ligeramente distinto entre ellas en el momento del estudio.

2) Mortalidad relacionada con la anestesia.

Sólo las ratas anestesiadas con la combinación Ketamina+Diazepam, pero no las anestesiadas con sevoflurano, presentaron mortalidad durante la preparación y realización del estudio hemodinámico, rozando dicha diferencia la significación estadística (grupos **Sevo**: 0% vs. grupos **KD**: 20,8 %; $p=0,065$). Estos resultados son similares a los encontrados en otros estudios en los que se ha utilizado la ketamina en combinación tanto con diazepam como xilacina. Así, Wixson *et al* describieron una mortalidad de entre el 10-50 % con la combinación de Ketamina+Diazepam y de hasta el 36 % con ketamina+xilacina en una serie de artículos dirigidos a valorar la influencia de distintos regímenes anestésicos sobre la nocicepción, temperatura y sistema cardiorrespiratorio en ratas normales (184, 195, 198, 199). En ratas cirróticas, Van Roey *et al* también observaron una mortalidad superior al 30 % en aquellas anestesiadas con ketamina (187).

3) Cumplimiento de las guías de administración.

En todos los estudios mencionados previamente, los fármacos se administraron por vía intraperitoneal (184, 195, 198, 199) (187). En roedores, la vía intraperitoneal es preferible a la vía intramuscular debido a la baja masa muscular de los mismos, la cual es un factor limitante del volumen de inyección de los anestésicos. En los modelos animales de hipertensión portal, sin embargo, la vía intramuscular se ha preferido tradicionalmente sobre la vía intraperitoneal, ya que ésta última puede interferir más con la hemodinámica esplácnica por su absorción mesentérica y se considera menos segura. Así, se ha descrito hasta un 24 % de inyecciones fallidas con la ruta intraperitoneal en roedores, y su administración puede causar una irritación peritoneal

que dificulte estudiar procesos como la ascitis (200, 201). Por estas razones, y al igual que en estudios experimentales de hipertensión portal previos, en nuestro trabajo utilizamos la vía intramuscular. Es importante destacar que los volúmenes de inyección administrados de Ketamina+Diazepam fueron entre un 150 % y un 435 % superiores a los recomendados para esta ruta parenteral (no más de 0,1-0,2 mL por lugar de inyección) (162, 173). Los mayores niveles de AST y lactato, y los valores más bajos de HCO₃ observados en los dos grupos anestesiados con Ketamina+Diazepam posiblemente estén en relación con una necrosis muscular producida por la inyección de estos grandes volúmenes.

4) Parámetros cardio-respiratorios.

Ambos regímenes anestésicos tuvieron un efecto similar sobre la presión arterial media en ratas con o sin hipertensión portal, pero la frecuencia cardíaca y la frecuencia respiratoria fueron más altas en los grupos anestesiados con Ketamina+Diazepam que en aquellos anestesiados con sevoflurano. Estos resultados están en la línea de estudios previos en los que la combinación Ketamina+Diazepam producía una menor depresión respiratoria que otros regímenes anestésicos (184, 185), habiéndose descrito también un incremento de la frecuencia respiratoria con la utilización aislada de ketamina (202).

Con respecto a los efectos de estos regímenes anestésicos sobre la hemodinámica sistémica en ratas normales o con hipertensión portal, nuestros resultados son similares a los descritos en estudios previos, aunque las sustanciales diferencias metodológicas hacen que no sean totalmente comparables (p.ej. modelo animal, cepa, edad o ruta de administración de la ketamina) (Tablas 7 y 8). Los primeros estudios que valoraron la influencia de la anestesia sobre la hemodinámica sistémica y regional tuvieron como grupo control a ratas conscientes con y sin hipertensión portal tanto en condiciones de normovolemia como de hipovolemia. El objetivo de dichos estudios era determinar cuál de los regímenes anestésicos afectaba menos al sistema cardiovascular y se asemejaba más al estado hemodinámico del grupo control. Para

ello, utilizaron ratas en las que se realizaban las mediciones hemodinámicas en un estado totalmente consciente (sin administración de ningún anestésico), utilizando catéteres insertados previamente bajo sedación con pentobarbital (114, 115, 166, 177-179, 186-188). Aunque hay autores que consideran que los estudios hemodinámicos debieran realizarse en estado consciente (187), este tipo de diseño experimental podría considerarse inadecuado por cuestiones éticas en la actualidad. La ketamina fue uno de los agentes más estudiados (generalmente sin asociar diazepam o xilacina), además de otros fármacos que actualmente no se emplean como el halotano, el éter, el enflurano, o el pentobarbital. En aquellos estudios realizados en ratas sin hipertensión portal, todos los anestésicos redujeron tanto la frecuencia cardíaca como la presión arterial media, pero la ketamina fue la que menos los afectó en comparación con el grupo control (177, 179). En el único estudio en ratas sin cirrosis en el que se comparó la ketamina con el isoflurano (anestésico halogenado de efectos similares al sevoflurano), se observó que el isoflurano se acompañaba de una mayor reducción de la presión arterial media y de la frecuencia cardíaca, aunque dicha disminución era menor que la producida por el resto de anestésicos evaluados (halotano y enflurano) (179). En ratas con cirrosis biliar inducida por la LC, por el contrario, la ketamina y el isoflurano redujeron de forma similar la presión arterial media y no afectaron a la frecuencia cardíaca en comparación con ratas cirróticas en estado consciente (186). Estos resultados contrastan con las observaciones realizadas en los estudios de Sikuler *et al* (115) y Van Roey *et al* (187), ambos realizados utilizando anestesia con ketamina. Mientras que los primeros observaron una mayor presión arterial media en ratas con cirrosis inducida por LC en comparación con el grupo control, los segundos encontraron que la presión arterial media permanecía inalterada en ratas con cirrosis inducida por CCl₄. Pese a que actualmente la ketamina se suele utilizar en combinación con otros fármacos como el diazepam o xilacina para disminuir sus efectos secundarios, son pocos los estudios que han valorado los efectos de la combinación de Ketamina+Diazepam sobre parámetros cardiovasculares, y ninguno de ellos ha sido realizado en ratas con hipertensión portal. Así, en estudios realizados en ratas normales en condiciones de normovolemia e hipovolemia, se ha observado que la combinación de Ketamina+Diazepam aumenta la presión arterial media y la

frecuencia cardíaca comparada con otros anestésicos, como el isoflurano o la combinación ketamina+xilazina (183) (184) (185). Estos resultados están acordes a los encontrados en nuestro trabajo, en el que la administración de la combinación de Ketamina+Diazepam resultó en una mayor frecuencia cardíaca tanto en ratas normales como con hipertensión portal que en aquellas ratas anestesiadas con sevoflurano. La medición de la presión arterial media en nuestro estudio, por el contrario, no estuvo influida por el tipo de régimen anestésico empleado.

5) Medición de la presión portal.

Son pocos los estudios que hayan valorado los efectos de la anestesia con ketamina sobre la presión portal. Van Roey *et al* no objetivaron ningún efecto de la ketamina sobre la presión portal ni en ratas normales ni en ratas con cirrosis hepática inducida por CCl₄ (187). Hasta donde sabemos, ningún otro estudio ha evaluado los efectos del sevoflurano o de la ketamina (ya sea como anestésico aislado o en combinación con diazepam) sobre la presión portal. Nuestro estudio, por tanto, aporta información valiosa en el sentido que demuestra que la medición de la presión portal no se ve influenciada por el uso de Ketamina+Diazepam en comparación con el uso de sevoflurano. Desgraciadamente, en nuestro trabajo no pudimos evaluar los posibles efectos de la combinación Ketamina+Diazepam en comparación con el sevoflurano sobre el flujo portal o arterial hepático, un aspecto del que sí existe más información sobre el efecto de anestésicos en la literatura. En ratas normales, por ejemplo, se ha descrito que la ketamina aumenta el flujo portal y puede tener un efecto variable sobre el flujo hepático arterial, ya que se han observado tanto una reducción (179) como una ausencia de efecto sobre el mismo (115, 177). Por su parte, el sevoflurano e isoflurano no afectaron el flujo portal ni arterial hepático en estudios previos realizados (179, 180). En ratas con hipertensión portal, el isoflurano tampoco afectó el flujo portal ni arterial hepático (186); la ketamina, por el contrario, redujo el flujo arterial hepático pero no afectó el flujo portal en ratas cirróticas por LC (115, 186).

Finalmente, ninguno de los regímenes anestésicos utilizados en nuestro trabajo alteraron los parámetros de función hepática. Es cierto que el uso de la combinación de Ketamina+Diazepam se asoció a una curiosa elevación de los valores de la serie roja respecto al resto de grupos, pero esta observación es probablemente irrelevante dado que todos los valores se mantuvieron dentro del rango fisiológico normal. Del mismo modo, los niveles más elevados de fibrinógeno y sodio sérico y más disminuidos de glucosa y fosfatasa alcalina encontrados en las ratas con LPVP comparados con las ratas controles están también dentro del rango de la normalidad y están en relación con la respuesta inflamatoria postquirúrgica y alteraciones propias de la LPVP, no estando influidas por el tipo de régimen anestésico (162, 203). Aunque en nuestro trabajo no se incluyó un modelo de cirrosis hepática para evaluar una posible influencia de la enfermedad hepática avanzada en los efectos de los anestésicos utilizados, es poco probable que tal influencia exista dado el bajo metabolismo hepático del sevoflurano y la ausencia de efectos de la ketamina sobre la presión arterial media o la presión portal descrita en ratas con cirrosis hepática inducida por LC y CCl₄ en estudios previos (115, 186, 187). Nuestro trabajo, por tanto, valida la utilización de la anestesia con sevoflurano para la realización de estudios hemodinámicos sistémicos y hepáticos en ratas normales o con hipertensión portal.

III. ¿ES BENEFICIOSO EL TRATAMIENTO A LARGO PLAZO CON ENOXAPARINA EN LA CIRROSIS HEPÁTICA AVANZADA EXPERIMENTAL?

En los últimos años, la posibilidad de que el tratamiento con anticoagulantes, particularmente con enoxaparina, pueda influir eventos patogénicos relevantes de la historia natural de la cirrosis hepática está recibiendo una creciente atención. Estas expectativas derivan de la comunicación de discretos efectos beneficiosos del tratamiento con anticoagulantes contra el desarrollo de fibrosis en varios estudios experimentales (13-20, 92) y, sobre todo, de los resultados obtenidos en dos estudios clínicos que evaluaron la eficacia de la heparina para mejorar la fibrosis o prevenir el desarrollo de trombosis portal en pacientes con enfermedad hepática. En estos estudios clínicos, Shi *et al* observaron una disminución de la fibrosis y una mejoría de

los parámetros de función hepática en pacientes con hepatitis B crónica tratados con heparina de bajo peso molecular o con heparina no fraccionada durante 3 semanas (204). En un estudio clínico más reciente, Villa *et al* observaron que la administración de enoxaparina a dosis profiláctica en pacientes con cirrosis hepática (Child B7-C10) no solo previno el desarrollo de trombosis portal, sino que también retrasó la aparición de complicaciones de la enfermedad y aumentó la supervivencia (72). Aunque es concebible que la prevención de la trombosis portal por la enoxaparina podría haber contribuido a disminuir la progresión de la enfermedad a través de una disminución de la fibrosis (por prevenir la extinción parenquimatosa y la activación de las células estrelladas por la trombina) y de la congestión esplácnica, amplios estudios observacionales recientes sugieren que el desarrollo de trombosis portal no se acompaña de un mayor riesgo de progresión de la enfermedad ni de un aumento de la mortalidad (60, 205). Este hecho, junto con la falta de proporcionalidad entre el efecto sobre la prevención de la trombosis portal y los beneficios observados en la prevención de complicaciones y aumento de supervivencia en el estudio de Villa *et al*, apuntan a que la enoxaparina podría tener efectos beneficiosos en pacientes con cirrosis independientes de la prevención de la trombosis portal. Con esta información de base, pensamos que era importante realizar un estudio en distintos modelos experimentales para investigar la posible influencia de la dosis de enoxaparina utilizada y de su administración a largo plazo, realizando una evaluación exhaustiva conjunta de sus efectos sobre el desarrollo de fibrosis, disfunción hepática, hipertensión portal y disfunción endotelial. A pesar de su importancia, estos dos últimos aspectos no han sido explorados en ningún estudio experimental previo.

Desgraciadamente, en nuestro trabajo no observamos ningún efecto beneficioso de la administración de enoxaparina, en distintas dosis, sobre ninguno de los parámetros evaluados. Así, la administración de la enoxaparina, en una variedad de modelos experimentales de cirrosis, no previno ni disminuyó el desarrollo de fibrosis y disfunción hepática, ni la hipertensión portal y ascitis, ni la infección del líquido ascítico o la respuesta inflamatoria, ni la disfunción endotelial propia de la vascularización del hígado con cirrosis. Al contrario, las ratas con cirrosis hepática inducida por CCl₄ oral

que recibieron una dosis alta de enoxaparina (180 UI/kg) mostraron una mayor mortalidad que el resto de los grupos, con tan sólo 2 ratas alcanzando el final del estudio. Este grupo (**CCl4-Enox180**) fue excluido del resto de comparaciones, ya que su inclusión introduciría un importante sesgo de selección al tratarse probablemente de ratas con una baja susceptibilidad al daño inducido por el CCl4 (uno de los inconvenientes de este modelo). En cualquier caso, la incorporación de las ratas del grupo **CCl4-Enox180** al análisis estadístico no se acompañó de diferencias en el grado de fibrosis o en los parámetros hemodinámicos comparado con los otros grupos de ratas con cirrosis (**CCl4-Salino** y **CCl4-Enox40**) (datos no mostrados). El tratamiento con enoxaparina a dosis alta (180 UI/kg), por el contrario, no influyó en la mortalidad en el modelo de cirrosis biliar inducida por LC (que fue menor que la del modelo por CCl4), pero tampoco influyó en el desarrollo de fibrosis, de hipertensión portal o de la infección del líquido ascítico.

La ausencia de efectos de la enoxaparina sobre el desarrollo de fibrosis hepática es una observación sólida y concluyente de nuestro trabajo, con gran consistencia en las dos dosis de enoxaparina utilizadas y en todos los modelos experimentales explorados (cirrosis hepática inducida por CCl4 y por LC). Más aún, la ausencia de efectos de la enoxaparina se demostró no sólo a nivel de cuantificación del área de fibrosis hepática en cada rata mediante dos tinciones histológicas (rojo Sirio y tricrómica de Masson) sino también, de forma más fina, a nivel de la expresión de varios genes (*Col1a1*, *Timp1*, *Acta2*) relacionados con el desarrollo de fibrosis en el hígado.

Nuestros resultados contrastan con estudios experimentales previos en los que se observaron efectos beneficiosos de diversas heparinas de bajo peso molecular y de la heparina no fraccionada sobre la fibrosis hepática (13-20). Dichos estudios utilizaron distintos modelos animales, y distintos tipos de heparina, de dosis, de duración y de ruta de administración (Tabla 9). Es importante destacar que, en el único estudio que comparó en paralelo varios tipos de heparinas, la eficacia de cada una de ellas para disminuir el daño y fibrosis hepáticas fue diferente, presentando algunas incluso efectos deletéreos (14). En dicho estudio, las ratas con cirrosis biliar inducida por LC

que recibieron nadroparina presentaron una reducción de la fibrosis mayor que la producida por la enoxaparina, mientras que la administración de heparina no fraccionada y de tinzaparina se asoció, respectivamente, a una elevación de los niveles de bilirrubina y a un empeoramiento de la fibrosis (14). Una posible explicación podría ser que la nadroparina y la enoxaparina poseen un ratio anti-Xa:anti-IIa mayor que la tinzaparina (3,6-3,8 vs. 1,8) y un perfil farmacocinético mejor que la heparina no fraccionada (206). La utilización de heparina no fraccionada a dosis más elevadas, sin embargo, sí que resultó en una disminución de la fibrosis y de la colestasis en otro estudio realizado en ratas con cirrosis inducida por CCl₄ (20).

Existen varias razones que pueden explicar la discrepancia entre nuestros hallazgos y los efectos beneficiosos de las heparinas de bajo peso molecular y de la heparina no fraccionada observados en estudios previos. En primer lugar, los efectos beneficiosos encontrados en estudios experimentales previos fueron generalmente menores y en ocasiones, como se ha mencionado anteriormente, discrepantes. En todos ellos, además, la valoración de la eficacia de la heparina se limitó casi exclusivamente a la extensión de la fibrosis, sin evaluar conjuntamente otros aspectos que también es esperable que se modifiquen en presencia de una mejoría de la fibrosis. Creemos que tal evaluación conjunta, como la realizada en nuestro trabajo, hubiese aportado mayor solidez a sus resultados. El protocolo de administración de enoxaparina es otra diferencia metodológica importante entre nuestro trabajo y los estudios previos. Mientras que en estos últimos las heparinas fueron administradas desde el comienzo de los modelos (antes de que se hubiera desarrollado una cirrosis hepática), en nuestro trabajo administramos la enoxaparina a partir de la octava semana de administración del CCl₄ (momento en el que están plenamente establecidas las alteraciones estructurales propias de la cirrosis) (129). Sólo en el modelo de cirrosis biliar inducida por LC iniciamos la administración de enoxaparina antes del desarrollo de cirrosis pero, a diferencia del estudio de Abdel-Salam *et al* (14), prolongamos su duración una semana más para poder valorar su eficacia en un estadio más avanzado de la enfermedad hepática. Esta diferencia es importante, ya que tanto la farmacocinética como farmacodinamia de la enoxaparina puede alterarse en función

de la gravedad del daño hepático. Así, se ha descrito un aumento del efecto anticoagulante de la heparina no fraccionada y de las heparinas de bajo peso molecular en muestras de suero de pacientes cirróticos (207, 208).

Dada la ausencia de efectos de la enoxaparina sobre la fibrosis hepática encontrada en nuestro trabajo, la exploración de posibles mecanismos fue relativamente limitada. Basados en la disminución de biomarcadores de daño enterocítico y de la activación inmune frente a productos bacterianos encontrada en pacientes tratados con enoxaparina comparado con el grupo placebo, los autores del estudio clínico de Villa *et al* sugirieron que los efectos beneficiosos de la enoxaparina podrían haberse debido a una mejoría de la microcirculación intestinal que resultaría en un menor daño enterocítico y, con ello, en una menor translocación bacteriana (72). Los datos procedentes de nuestro estudio, sin embargo, no permiten apoyar dicha hipótesis, ya que el tratamiento con enoxaparina no redujo la frecuencia de infección del líquido ascítico (marcador, aunque poco preciso, de episodios de translocación bacteriana) ni los niveles de IL-6 circulante (marcador de la respuesta inflamatoria sistémica) en las ratas con cirrosis inducida por CCl₄ ni en las ratas con cirrosis inducida por LC. Otros potenciales mecanismos de actuación de la enoxaparina, como por ejemplo el aumento de niveles de factor de crecimiento hepatocitario o la disminución del factor de crecimiento transformante beta-1, no fueron evaluados en nuestro estudio (16).

Otro hallazgo relevante de nuestro trabajo fue la ausencia de efectos de la enoxaparina sobre la hipertensión portal y la disfunción endotelial propia de la cirrosis hepática. Ningún estudio publicado en forma de manuscrito original ha realizado una evaluación específica de los efectos de la heparina sobre estos parámetros. Tan sólo en un trabajo presentado en forma de Abstract en el congreso de la European Association for the Study of the Liver de 2013, se comunicó que la administración de enoxaparina a dosis alta (180 UI/kg) durante una semana disminuyó la fibrosis y la hipertensión portal en ratas con cirrosis temprana inducida por CCl₄ inhalado (92). Aunque la ausencia de efectos de la enoxaparina sobre la presión portal encontrada en nuestro trabajo fue consistente en todo el espectro de dosis y modelos experimentales utilizados, no

podemos descartar que un tratamiento limitado en el tiempo como el utilizado en el estudio comentado pueda tener efectos temporales sobre la fibrosis y la presión portal, ya que todas nuestras evaluaciones fueron realizadas al final del seguimiento. Teóricamente, los efectos pleiotrópicos de la enoxaparina podrían reducir la presión portal por mecanismos adicionales a su potencial efecto antifibrótico. El desarrollo de hipertensión portal en la cirrosis hepática se debe a un aumento de la resistencia vascular hepática (mecanismo primario) y del flujo portal (mecanismo perpetuador y agravante) (209). El aumento de la resistencia vascular hepática es consecuencia de la distorsión del parénquima hepático y de un aumento del tono vascular secundario a una mayor producción de agentes vasoconstrictores y a una menor liberación de sustancias vasodilatadoras por disfunción de las células endoteliales sinusoidales hepáticas (210). La angiogénesis juega un papel fundamental en el segundo mecanismo al favorecer la hiperemia esplácnica, y podría contribuir también a aumentar la resistencia vascular hepática (210). Finalmente, un daño hepático agudo con su inflamación asociada puede agravar la hipertensión portal o incluso ser su causa en ausencia de cirrosis hepática (211). Por lo tanto, la potencial capacidad de la enoxaparina para mejorar la disfunción endotelial (28, 29) y sus potenciales efectos anti-angiogénicos (26, 27) y anti-inflamatorios (22-25) podrían influir beneficiosamente en los dos mecanismos patogénicos de la hipertensión portal mencionados. En el presente trabajo, sin embargo, la enoxaparina no redujo la presión portal en ninguno de los modelos animales evaluados. Más aún, no observamos ningún efecto beneficioso de la enoxaparina a dosis baja (40 UI/kg/24h) sobre la disfunción endotelial en los estudios de perfusión de hígado aislado realizados para valorar su efecto sobre la vasodilatación dependiente e independiente del endotelio tanto del lecho portal como del arterial hepático. Por el contrario, la administración de dosis altas de enoxaparina (180 UI/kg/24h) desde el inicio de la exposición a CCl₄ inhalado resultó en un empeoramiento de la disfunción endotelial con un aumento de las resistencias sinusoidal y de la arteria hepática.

11. RESUMEN

En resumen, los hallazgos de nuestro trabajo para cada uno de los Objetivos fueron los siguientes:

Objetivo I.A: Comparación de dos protocolos de inducción de cirrosis hepática en ratas basados en la administración oral de CCl₄.

1. Tanto el protocolo de administración de CCl₄ de Runyon como el protocolo de Regimbeau modificado fueron eficaces para inducir cirrosis hepática e hipertensión portal en ratas.
2. En comparación con el protocolo de Runyon, el protocolo de Regimbeau modificado desarrollado en nuestro trabajo resultó en:
 - a. Una mortalidad asociada similar.
 - b. Una curva de ganancia de peso corporal más uniforme.
 - c. Alteraciones de parámetros hematológicos, bioquímicos y de función hepática sugestivos de enfermedad hepática más avanzada.
 - d. Parámetros cardio-respiratorios similares, salvo por una ligera disminución de la presión arterial media y de la frecuencia cardíaca.
 - e. Un mayor grado de hipertensión portal, esplenomegalia y trombopenia, y una mayor incidencia de ascitis.
 - f. Desarrollo de un mayor grado de fibrosis y de atrofia hepática.

Objetivo I.B: Comparación de los efectos de la anestesia con sevoflurano con los de la anestesia con Ketamina+Diazepam en ratas normales y en ratas con hipertensión portal inducida por la ligadura parcial de la vena porta (LPVP).

En comparación con la combinación Ketamina+Diazepam, la utilización de anestesia inhalada con sevoflurano resultó en:

1. Unos parámetros anatómicos generales similares, incluyendo el grado de atrofia hepática y esplenomegalia en las ratas con LPVP.
2. Una mayor estabilidad de la anestesia, con una menor necesidad de ajuste de dosis, y una mayor pero menos variable depresión respiratoria.

3. Una menor mortalidad asociada a la anestesia.
4. Unos niveles circulantes de AST, lactato y bicarbonato más cercanos a la normalidad.
5. Unos parámetros hemodinámicos sistémicos similares, salvo por una ligera disminución de la frecuencia cardíaca.
6. Una precisión similar en la medida de la presión portal tanto en ratas normales como en ratas con hipertensión portal.

Objetivo II: Determinación de los efectos de la enoxaparina, incluyendo la evaluación de distintas dosis, sobre la fibrosis hepática, la hipertensión portal y la disfunción endotelial, utilizando 3 modelos experimentales de cirrosis hepática.

1. En ratas con cirrosis hepática inducida por la administración de CCl₄ oral, la administración crónica de dosis bajas (40 UI/kg/24h) o altas (180 UI/kg/24h) de enoxaparina:
 - a. No redujo la mortalidad asociada al modelo; al contrario, la mortalidad incluso aumentó en el grupo tratado con dosis altas.
 - b. No atenuó la tendencia a una menor ganancia de peso corporal asociada a la administración de CCl₄.
 - c. No influyó en el deterioro de los parámetros hematológicos, bioquímicos o gasométricos característicos de la cirrosis; al contrario, el tratamiento con enoxaparina se asoció a menores niveles plasmáticos de fibrinógeno y mayores de bilirrubina y de potasio.
 - d. No atenuó cualitativa ni cuantitativamente el desarrollo de fibrosis hepática, la inducción de genes pro-fibrogénicos en el hígado, ni el desarrollo de atrofia hepática.
 - e. No influyó en ninguno de los parámetros cardio-respiratorios evaluados.
 - f. No atenuó el grado de hipertensión portal, esplenomegalia o trombopenia, ni la incidencia de ascitis.
 - g. No influyó ni en el desarrollo de infección del líquido ascítico ni en los niveles circulantes de IL-6.

2. En ratas con cirrosis biliar inducida por la ligadura del colédoco (LC), la administración crónica de dosis altas (180 UI/kg/24h) de enoxaparina:
 - a. No influyó en la mortalidad, la cual fue prácticamente nula en este modelo experimental.
 - b. No atenuó el empeoramiento de la ganancia de peso corporal asociada al desarrollo de cirrosis biliar.
 - c. No influyó en el deterioro de los parámetros hematológicos o bioquímicos característicos de la cirrosis, salvo por una ligera atenuación de las elevaciones de bilirrubina e INR.
 - d. No atenuó cualitativa ni cuantitativamente el desarrollo de fibrosis hepática, la inducción de genes pro-fibrogénicos en el hígado, ni el desarrollo de hepatomegalia.
 - e. No influyó en ninguno de los parámetros cardio-respiratorios evaluados.
 - f. No atenuó el grado de hipertensión portal y esplenomegalia ni la incidencia de ascitis; al contrario, el tratamiento con enoxaparina se asoció a un mayor grado de hipertensión portal.
 - g. No influyó ni en el desarrollo de infección del líquido ascítico ni en los niveles circulantes de IL-6.
3. En ratas con cirrosis hepática inducida por la inhalación de CCl₄, la administración de dosis bajas (40 UI/kg/24h) de enoxaparina:
 - a. No atenuó el empeoramiento de la respuesta vasodilatadora del árbol portal y sinusoidal hepático característico de la cirrosis hepática, evaluada en experimentos de perfusión portal aislada ex-vivo.
 - b. No influyó en la respuesta vasoconstrictora de la arteria hepática, evaluada en experimentos de perfusión bivascular hepática ex-vivo.
4. En ratas con cirrosis hepática inducida por la inhalación de CCl₄, la administración de dosis altas (180 UI/kg/24h) de enoxaparina desde el inicio de la exposición a CCl₄:
 - a. Empeoró la deficiente respuesta vasodilatadora del árbol portal y sinusoidal hepático característica de la cirrosis hepática, evaluada en experimentos de perfusión portal aislada ex-vivo.

- b. Aumentó la respuesta vasoconstrictora de la arteria hepática en ausencia de inhibición de la síntesis de óxido nítrico sin influir en la misma cuando la síntesis de óxido nítrico fue inhibida, evaluada en experimentos de perfusión hepática bivascular ex-vivo.

12. CONCLUSIONES

Las conclusiones derivadas de los resultados de nuestro trabajo son las siguientes:

1. El protocolo de Regimbeau modificado desarrollado en nuestro trabajo representa un método más acelerado, eficaz y altamente reproducible de inducción de cirrosis hepática, hipertensión portal y ascitis por administración de CCl₄ en comparación con el protocolo clásico de Runyon, sin asociar una mayor mortalidad.
2. La anestesia inhalada con sevoflurano es preferible a la anestesia intramuscular con Ketamina+Diazepam para la realización de estudios hemodinámicos sistémicos y hepáticos en ratas con y sin hipertensión portal por:
 - a. Su mayor estabilidad.
 - b. Su menor mortalidad asociada.
 - c. Evitar la inyección de volúmenes superiores a los recomendados por vía intramuscular en pequeños animales, probable causa de necrosis muscular con aumento de la AST.
 - d. Su idéntica capacidad para la realización de mediciones válidas y precisas de la presión portal.
3. La administración crónica de enoxaparina a dosis altas o bajas no mejora la fibrosis hepática, la hipertensión portal o la disfunción endotelial en diversos modelos experimentales de cirrosis hepática avanzada en rata, sugiriendo que el protocolo de administración y, sobre todo, el estadio de la cirrosis hepática pueden ser factores determinantes para la obtención de efectos beneficiosos del uso de la enoxaparina.

13. BIBLIOGRAFÍA

1. Anthony PP, Ishak KG, Nayak NC, Poulsen HE, Scheuer PJ, Sobin LH. The morphology of cirrhosis. Recommendations on definition, nomenclature, and classification by a working group sponsored by the World Health Organization. *Journal of clinical pathology*. 1978;31(5):395-414.
2. Schuppan D, Afdhal NH. Liver cirrhosis. *Lancet*. 2008;371(9615):838-51.
3. Garcia-Pagan JC, Gracia-Sancho J, Bosch J. Functional aspects on the pathophysiology of portal hypertension in cirrhosis. *Journal of hepatology*. 2012;57(2):458-61.
4. Albilllos A, Garcia-Tsao G. Classification of cirrhosis: the clinical use of HVPG measurements. *Disease markers*. 2011;31(3):121-8.
5. Vorobioff JD, Groszmann RJ. Prevention of portal hypertension: From variceal development to clinical decompensation. *Hepatology*. 2015;61(1):375-81.
6. Garcia-Tsao G, Friedman S, Iredale J, Pinzani M. Now there are many (stages) where before there was one: In search of a pathophysiological classification of cirrhosis. *Hepatology*. 2010;51(4):1445-9.
7. Friedman SL, Bansal MB. Reversal of hepatic fibrosis -- fact or fantasy? *Hepatology*. 2006;43(2 Suppl 1):S82-8.
8. Manne V, Akhtar E, Saab S. Cirrhosis regression in patients with viral hepatitis B and C: a systematic review. *Journal of clinical gastroenterology*. 2014;48(9):e76-84.
9. Sohrabpour AA, Mohamadnejad M, Malekzadeh R. Review article: the reversibility of cirrhosis. *Alimentary pharmacology & therapeutics*. 2012;36(9):824-32.
10. Issa R, Zhou X, Constandinou CM, Fallowfield J, Millward-Sadler H, Gaca MDA, et al. Spontaneous recovery from micronodular cirrhosis: Evidence for incomplete resolution associated with matrix cross-linking☆. *Gastroenterology*. 2004;126(7):1795-808.
11. Jiao J, Friedman SL, Aloman C. Hepatic fibrosis. Current opinion in gastroenterology. 2009;25(3):223-9.
12. Torok NJ, Dranoff JA, Schuppan D, Friedman SL. Strategies and endpoints of antifibrotic drug trials: Summary and recommendations from the AASLD Emerging Trends Conference, Chicago, June 2014. *Hepatology*. 2015;62(2):627-34.

13. Nakao T, Arii S, Kaido T, Mori A, Murata T, Matsumori A, et al. Heparin accelerates liver regeneration following portal branch ligation in normal and cirrhotic rats with increased plasma hepatocyte growth factor levels. *Journal of hepatology*. 2002;37(1):87-92.
14. Abdel-Salam OM, Baiuomy AR, Ameen A, Hassan NS. A study of unfractionated and low molecular weight heparins in a model of cholestatic liver injury in the rat. *Pharmacological research : the official journal of the Italian Pharmacological Society*. 2005;51(1):59-67.
15. Li W, Zhang J, Huang Q, Zhu H, Zhang X. Long-term administering low anticoagulant activity heparin can lessen rat hepatic fibrosis induced by either CCl(4) or porcine serum injection. *Hepatology research : the official journal of the Japan Society of Hepatology*. 2006;36(2):115-23.
16. Abe W, Ikejima K, Lang T, Okumura K, Enomoto N, Kitamura T, et al. Low molecular weight heparin prevents hepatic fibrogenesis caused by carbon tetrachloride in the rat. *Journal of hepatology*. 2007;46(2):286-94.
17. Assy N, Hussein O, Khalil A, Luder A, Szvalb S, Paizi M, et al. The beneficial effect of aspirin and enoxaparin on fibrosis progression and regenerative activity in a rat model of cirrhosis. *Digestive diseases and sciences*. 2007;52(5):1187-93.
18. Kukner A, Tore F, Firat T, Terzi EH, Oner H, Balaban YH, et al. The preventive effect of low molecular weight heparin on CCL(4)-induced necrosis and apoptosis in rat liver. *Annals of hepatology*. 2010;9(4):445-54.
19. Lee JH, Lee H, Joung YK, Jung KH, Choi JH, Lee DH, et al. The use of low molecular weight heparin-pluronic nanogels to impede liver fibrosis by inhibition the TGF-beta/Smad signaling pathway. *Biomaterials*. 2011;32(5):1438-45.
20. Shah B, Shah G. Antifibrotic effect of heparin on liver fibrosis model in rats. *World journal of gastrointestinal pharmacology and therapeutics*. 2012;3(6):86-92.
21. Gozdzikiewicz J, Borawski J, Mysliwiec M. Pleiotropic effects of heparin and heparinoids in peritoneal dialysis. *Clinical and applied thrombosis/hemostasis : official journal of the International Academy of Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis*. 2009;15(1):92-7.

22. Tyrell DJ, Kilfeather S, Page CP. Therapeutic uses of heparin beyond its traditional role as an anticoagulant. *Trends in pharmacological sciences*. 1995;16(6):198-204.
23. Hochart H, Jenkins PV, Smith OP, White B. Low-molecular weight and unfractionated heparins induce a downregulation of inflammation: decreased levels of proinflammatory cytokines and nuclear factor-kappaB in LPS-stimulated human monocytes. *British journal of haematology*. 2006;133(1):62-7.
24. Tsukada S, Enomoto N, Takei Y, Hirose M, Ikejima K, Kitamura T, et al. Dalteparin sodium prevents liver injury due to lipopolysaccharide in rat through suppression of tumor necrosis factor-alpha production by Kupffer cells. *Alcoholism, clinical and experimental research*. 2003;27(8 Suppl):7s-11s.
25. Deepa PR, Varalakshmi P. Influence of a low-molecular-weight heparin derivative on the nitric oxide levels and apoptotic DNA damage in adriamycin-induced cardiac and renal toxicity. *Toxicology*. 2006;217(2-3):176-83.
26. Norrby K. Low-molecular-weight heparins and angiogenesis. *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica*. 2006;114(2):79-102.
27. Collen A, Smorenburg SM, Peters E, Lupu F, Koolwijk P, Van Noorden C, et al. Unfractionated and low molecular weight heparin affect fibrin structure and angiogenesis in vitro. *Cancer research*. 2000;60(21):6196-200.
28. Morrison AM, Wang P, Chaudry IH. A novel nonanticoagulant heparin prevents vascular endothelial cell dysfunction during hyperdynamic sepsis. *Shock*. 1996;6(1):46-51.
29. Georgescu A, Popov D, Capraru M, Simionescu M. Enoxaparin--a low molecular weight heparin, restores the altered vascular reactivity of resistance arteries in aged and aged-diabetic hamsters. *Vascular pharmacology*. 2003;40(3):167-74.
30. Lisman T, Leebeek FW, de Groot PG. Haemostatic abnormalities in patients with liver disease. *Journal of hepatology*. 2002;37(2):280-7.
31. Jairath V, Burroughs AK. Anticoagulation in patients with liver cirrhosis: complication or therapeutic opportunity? *Gut*. 2013;62(4):479-82.

32. Tripodi A, Primignani M, Chantarangkul V, Dell'Era A, Clerici M, de Franchis R, et al. An imbalance of pro- vs anti-coagulation factors in plasma from patients with cirrhosis. *Gastroenterology*. 2009;137(6):2105-11.
33. Tripodi A. Liver Disease and Hemostatic (Dys)function. *Seminars in thrombosis and hemostasis*. 2015;41(5):462-7.
34. Valla DC, Rautou PE. The coagulation system in patients with end-stage liver disease. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver*. 2015;35 Suppl 1:139-44.
35. Tripodi A, Caldwell SH, Hoffman M, Trotter JF, Sanyal AJ. Review article: the prothrombin time test as a measure of bleeding risk and prognosis in liver disease. *Alimentary pharmacology & therapeutics*. 2007;26(2):141-8.
36. Yang ZJ, Sheth SH, Smith CH, Schmotzer AR, Lippello AL, Al-Khafaji A, et al. Plasma from chronic liver disease subjects exhibit differential ability to generate thrombin. *Blood coagulation & fibrinolysis : an international journal in haemostasis and thrombosis*. 2015.
37. Ewe K. Bleeding after liver biopsy does not correlate with indices of peripheral coagulation. *Digestive diseases and sciences*. 1981;26(5):388-93.
38. Denzer U, Helmreich-Becker I, Galle PR, Lohse AW. Liver assessment and biopsy in patients with marked coagulopathy: value of mini-laparoscopy and control of bleeding. *The American journal of gastroenterology*. 2003;98(4):893-900.
39. Grabau CM, Crago SF, Hoff LK, Simon JA, Melton CA, Ott BJ, et al. Performance standards for therapeutic abdominal paracentesis. *Hepatology*. 2004;40(2):484-8.
40. Bosch J, Thabut D, Bendtsen F, D'Amico G, Albillos A, Gonzalez Abraldes J, et al. Recombinant factor VIIa for upper gastrointestinal bleeding in patients with cirrhosis: a randomized, double-blind trial. *Gastroenterology*. 2004;127(4):1123-30.
41. Bosch J, Thabut D, Albillos A, Carbonell N, Spicak J, Massard J, et al. Recombinant factor VIIa for variceal bleeding in patients with advanced cirrhosis: A randomized, controlled trial. *Hepatology*. 2008;47(5):1604-14.
42. Northup PG, Caldwell SH. Coagulation in liver disease: a guide for the clinician. *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association*. 2013;11(9):1064-74.

43. Bendtsen F, D'Amico G, Rusch E, de Franchis R, Andersen PK, Lebrech D, et al. Effect of recombinant Factor VIIa on outcome of acute variceal bleeding: an individual patient based meta-analysis of two controlled trials. *Journal of hepatology*. 2014;61(2):252-9.
44. Vieira da Rocha EC, D'Amico EA, Caldwell SH, Flores da Rocha TR, Soares ESCS, Dos Santos Bomfim V, et al. A prospective study of conventional and expanded coagulation indices in predicting ulcer bleeding after variceal band ligation. *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association*. 2009;7(9):988-93.
45. Tripodi A, Salerno F, Chantarangkul V, Clerici M, Cazzaniga M, Primignani M, et al. Evidence of normal thrombin generation in cirrhosis despite abnormal conventional coagulation tests. *Hepatology*. 2005;41(3):553-8.
46. Lisman T, Bakhtiari K, Pereboom IT, Hendriks HG, Meijers JC, Porte RJ. Normal to increased thrombin generation in patients undergoing liver transplantation despite prolonged conventional coagulation tests. *Journal of hepatology*. 2010;52(3):355-61.
47. Gatt A, Riddell A, Calvaruso V, Tuddenham EG, Makris M, Burroughs AK. Enhanced thrombin generation in patients with cirrhosis-induced coagulopathy. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. 2010;8(9):1994-2000.
48. Okuda K, Ohnishi K, Kimura K, Matsutani S, Sumida M, Goto N, et al. Incidence of portal vein thrombosis in liver cirrhosis. An angiographic study in 708 patients. *Gastroenterology*. 1985;89(2):279-86.
49. Belli L, Romani F, Sansalone CV, Aseni P, Rondinara G. Portal thrombosis in cirrhotics. A retrospective analysis. *Annals of surgery*. 1986;203(3):286-91.
50. Nonami T, Yokoyama I, Iwatsuki S, Starzl TE. The incidence of portal vein thrombosis at liver transplantation. *Hepatology*. 1992;16(5):1195-8.
51. Violi F, Ferro D, Basili S, D'Angelo A, Mazzola G, Quintarelli C, et al. Relation between lupus anticoagulant and splanchnic venous thrombosis in cirrhosis of the liver. *BMJ (Clinical research ed)*. 1994;309(6949):239-40.
52. Amitrano L, Brancaccio V, Guardascione MA, Margaglione M, Iannaccone L, D'Andrea G, et al. Inherited coagulation disorders in cirrhotic patients with portal vein thrombosis. *Hepatology*. 2000;31(2):345-8.

53. Amitrano L, Guardascione MA, Brancaccio V, Margaglione M, Manguso F, Iannaccone L, et al. Risk factors and clinical presentation of portal vein thrombosis in patients with liver cirrhosis. *Journal of hepatology*. 2004;40(5):736-41.
54. Francoz C, Belghiti J, Vilgrain V, Sommacale D, Paradis V, Condat B, et al. Splanchnic vein thrombosis in candidates for liver transplantation: usefulness of screening and anticoagulation. *Gut*. 2005;54(5):691-7.
55. Zocco MA, Di Stasio E, De Cristofaro R, Novi M, Ainora ME, Ponziani F, et al. Thrombotic risk factors in patients with liver cirrhosis: correlation with MELD scoring system and portal vein thrombosis development. *Journal of hepatology*. 2009;51(4):682-9.
56. Tsochatzis EA, Senzolo M, Germani G, Gatt A, Burroughs AK. Systematic review: portal vein thrombosis in cirrhosis. *Alimentary pharmacology & therapeutics*. 2010;31(3):366-74.
57. Englesbe MJ, Schaubel DE, Cai S, Guidinger MK, Merion RM. Portal vein thrombosis and liver transplant survival benefit. *Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society*. 2010;16(8):999-1005.
58. Maruyama H, Okugawa H, Takahashi M, Yokosuka O. De novo portal vein thrombosis in virus-related cirrhosis: predictive factors and long-term outcomes. *The American journal of gastroenterology*. 2013;108(4):568-74.
59. John BV, Konjeti R, Aggarwal A, Lopez R, Atreja A, Miller C, et al. Impact of untreated portal vein thrombosis on pre and post liver transplant outcomes in cirrhosis. *Annals of hepatology*. 2013;12(6):952-8.
60. Nery F, Chevret S, Condat B, de Raucourt E, Boudaoud L, Rautou PE, et al. Causes and consequences of portal vein thrombosis in 1,243 patients with cirrhosis: Results of a longitudinal study. *Hepatology*. 2015;61(2):660-7.
61. Stine JG, Shah NL, Argo CK, Pelletier SJ, Caldwell SH, Northup PG. Increased risk of portal vein thrombosis in patients with cirrhosis due to nonalcoholic steatohepatitis. *Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society*. 2015;21(8):1016-21.

62. Northup PG, McMahon MM, Ruhl AP, Altschuler SE, Volk-Bednarz A, Caldwell SH, et al. Coagulopathy does not fully protect hospitalized cirrhosis patients from peripheral venous thromboembolism. *The American journal of gastroenterology*. 2006;101(7):1524-8; quiz 680.
63. Garcia-Fuster MJ, Abdilla N, Fabia MJ, Fernandez C, Oliver V, Forner MJ. [Venous thromboembolism and liver cirrhosis]. *Revista española de enfermedades digestivas : organo oficial de la Sociedad Española de Patología Digestiva*. 2008;100(5):259-62.
64. Gulley D, Teal E, Suvannasankha A, Chalasani N, Liangpunsakul S. Deep vein thrombosis and pulmonary embolism in cirrhosis patients. *Digestive diseases and sciences*. 2008;53(11):3012-7.
65. Sogaard KK, Horvath-Puho E, Gronbaek H, Jepsen P, Vilstrup H, Sorensen HT. Risk of venous thromboembolism in patients with liver disease: a nationwide population-based case-control study. *The American journal of gastroenterology*. 2009;104(1):96-101.
66. Dabbagh O, Oza A, Prakash S, Sunna R, Saettele TM. Coagulopathy does not protect against venous thromboembolism in hospitalized patients with chronic liver disease. *Chest*. 2010;137(5):1145-9.
67. Lesmana CR, Inggriani S, Cahyadinata L, Lesmana LA. Deep vein thrombosis in patients with advanced liver cirrhosis: a rare condition? *Hepatology international*. 2010;4(1):433-8.
68. Wu H, Nguyen GC. Liver cirrhosis is associated with venous thromboembolism among hospitalized patients in a nationwide US study. *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association*. 2010;8(9):800-5.
69. Aldawood A, Arabi Y, Aljumah A, Alsaadi A, Rishu A, Aldorzi H, et al. The incidence of venous thromboembolism and practice of deep venous thrombosis prophylaxis in hospitalized cirrhotic patients. *Thrombosis journal*. 2011;9(1):1.
70. Aggarwal A, Puri K, Liangpunsakul S. Deep vein thrombosis and pulmonary embolism in cirrhotic patients: systematic review. *World journal of gastroenterology : WJG*. 2014;20(19):5737-45.

71. Hugenholtz GC, Northup PG, Porte RJ, Lisman T. Is there a rationale for treatment of chronic liver disease with antithrombotic therapy? *Blood reviews*. 2014.
72. Villa E, Camma C, Marietta M, Luongo M, Critelli R, Colopi S, et al. Enoxaparin prevents portal vein thrombosis and liver decompensation in patients with advanced cirrhosis. *Gastroenterology*. 2012;143(5):1253-60.e1-4.
73. Amitrano L, Guardascione MA, Scaglione M, Menchise A, Martino R, Manguso F, et al. Splanchnic vein thrombosis and variceal rebleeding in patients with cirrhosis. *European journal of gastroenterology & hepatology*. 2012;24(12):1381-5.
74. Bajaj JS, Franco J. Endoscopic band ligation of esophageal varices in patients on anticoagulation. *Journal of clinical gastroenterology*. 2008;42(7):782-5.
75. Cerini F, Gonzalez JM, Torres F, Puente A, Casas M, Vinaixa C, et al. Impact of anticoagulation on upper-gastrointestinal bleeding in cirrhosis. A retrospective multicenter study. *Hepatology*. 2015;62(2):575-83.
76. Seijo S, Garcia-Pagan JC. Anticoagulation in cirrhosis: ready ... set ... wait! *Hepatology*. 2013;58(3):1175-6.
77. Anstee QM, Dhar A, Thursz MR. The role of hypercoagulability in liver fibrogenesis. *Clinics and research in hepatology and gastroenterology*. 2011;35(8-9):526-33.
78. Intagliata NM, Northup PG. Anticoagulant Therapy in Patients with Cirrhosis. *Seminars in thrombosis and hemostasis*. 2015;41(5):514-9.
79. Wanless IR, Wong F, Blendis LM, Greig P, Heathcote EJ, Levy G. Hepatic and portal vein thrombosis in cirrhosis: possible role in development of parenchymal extinction and portal hypertension. *Hepatology*. 1995;21(5):1238-47.
80. Marra F, Grandaliano G, Valente AJ, Abboud HE. Thrombin stimulates proliferation of liver fat-storing cells and expression of monocyte chemotactic protein-1: potential role in liver injury. *Hepatology*. 1995;22(3):780-7.
81. Marra F, DeFranco R, Grappone C, Milani S, Pinzani M, Pellegrini G, et al. Expression of the thrombin receptor in human liver: up-regulation during acute and chronic injury. *Hepatology*. 1998;27(2):462-71.

82. Papatheodoridis GV, Papakonstantinou E, Andrioti E, Cholongitas E, Petraki K, Kontopoulou I, et al. Thrombotic risk factors and extent of liver fibrosis in chronic viral hepatitis. *Gut*. 2003;52(3):404-9.
83. Wright M, Goldin R, Hellier S, Knapp S, Frodsham A, Hennig B, et al. Factor V Leiden polymorphism and the rate of fibrosis development in chronic hepatitis C virus infection. *Gut*. 2003;52(8):1206-10.
84. Poujol-Robert A, Boelle PY, Poupon R, Robert A. Factor V Leiden as a risk factor for cirrhosis in chronic hepatitis C. *Hepatology*. 2004;39(4):1174-5.
85. Poujol-Robert A, Boelle PY, Wendum D, Poupon R, Robert A. Association between ABO blood group and fibrosis severity in chronic hepatitis C infection. *Digestive diseases and sciences*. 2006;51(9):1633-6.
86. Shavakhi A, Hajalikhani M, Minakari M, Norian A, Riahi R, Azarnia M, et al. The association of non-O blood group and severity of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C infection. *Journal of research in medical sciences : the official journal of Isfahan University of Medical Sciences*. 2012;17(5):466-9.
87. Maharshak N, Halfon P, Deutsch V, Peretz H, Berliner S, Fishman S, et al. Increased fibrosis progression rates in hepatitis C patients carrying the prothrombin G20210A mutation. *World journal of gastroenterology : WJG*. 2011;17(45):5007-13.
88. Papatheodoridis GV, Chrysanthos N, Cholongitas E, Pavlou E, Apergis G, Tiniakos DG, et al. Thrombotic risk factors and liver histologic lesions in non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of hepatology*. 2009;51(5):931-8.
89. Plompen EP, Murad SD, Hansen BE, Loth DW, Schouten JN, Taimr P, et al. Prothrombotic Genetic Risk Factors are associated with an Increased Risk of Liver Fibrosis in the General Population: The Rotterdam Study. *Journal of hepatology*. 2015.
90. Yee TT, Griffioen A, Sabin CA, Dusheiko G, Lee CA. The natural history of HCV in a cohort of haemophilic patients infected between 1961 and 1985. *Gut*. 2000;47(6):845-51.
91. Anstee QM, Goldin RD, Wright M, Martinelli A, Cox R, Thursz MR. Coagulation status modulates murine hepatic fibrogenesis: implications for the development of novel therapies. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. 2008;6(8):1336-43.

92. Cerini F, Gracia-Sancho J, Rodriguez-Vilarrupla A, Bosch J, García-Pagán JC. 576 EFFECTS OF ENOXAPARIN ADMINISTRATION ON CCl₄ CIRRHOTIC RATS WITH PORTAL HYPERTENSION. *Journal of hepatology*.58:S236.
93. Abraldes JG, Pasarin M, Garcia-Pagan JC. Animal models of portal hypertension. *World journal of gastroenterology : WJG*. 2006;12(41):6577-84.
94. Iredale JP. Models of liver fibrosis: exploring the dynamic nature of inflammation and repair in a solid organ. *The Journal of clinical investigation*. 2007;117(3):539-48.
95. Starkel P, Leclercq IA. Animal models for the study of hepatic fibrosis. *Best practice & research Clinical gastroenterology*. 2011;25(2):319-33.
96. Okazaki I, Maruyama K. Collagenase activity in experimental hepatic fibrosis. *Nature*. 1974;252(5478):49-50.
97. Vorobioff J, Bredfeldt JE, Groszmann RJ. Hyperdynamic circulation in portal-hypertensive rat model: a primary factor for maintenance of chronic portal hypertension. *The American journal of physiology*. 1983;244(1):G52-7.
98. Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council on the protection of animals used for scientific purposes. September 22, (2010).
99. Russell WMSBRL. The principles of humane experimental technique London: Methuen; 1959. Available from: <http://catalog.hathitrust.org/api/volumes/oclc/1486173.html>.
100. Poirier GM, Bergmann C, Denais-Lalieve DG, Dontas IA, Dudoignon N, Ehall H, et al. ESLAV/ECLAM/LAVA/EVERI recommendations for the roles, responsibilities and training of the laboratory animal veterinarian and the designated veterinarian under Directive 2010/63/EU. *Laboratory animals*. 2015;49(2):89-99.
101. Smith GP. Animal models of cutaneous and hepatic fibrosis. *Progress in molecular biology and translational science*. 2012;105:371-409.
102. Scholten D, Trebicka J, Liedtke C, Weiskirchen R. The carbon tetrachloride model in mice. *Laboratory animals*. 2015;49(1 Suppl):4-11.
103. Aller MA, Nava MP, Cuellar C, Chivato T, Arias JL, Sanchez-Patan F, et al. Evolutive phases of experimental prehepatic portal hypertension. *Journal of gastroenterology and hepatology*. 2007;22(7):1127-33.

104. Sikuler E, Kravetz D, Groszmann RJ. Evolution of portal hypertension and mechanisms involved in its maintenance in a rat model. *The American journal of physiology*. 1985;248(6 Pt 1):G618-25.
105. Colombato LA, Albillos A, Groszmann RJ. Temporal relationship of peripheral vasodilatation, plasma volume expansion and the hyperdynamic circulatory state in portal-hypertensive rats. *Hepatology*. 1992;15(2):323-8.
106. Albillos A, Colombato LA, Enriquez R, Ng OC, Sikuler E, Groszmann RJ. Sequence of morphological and hemodynamic changes of gastric microvessels in portal hypertension. *Gastroenterology*. 1992;102(6):2066-70.
107. Liu Y, Meyer C, Xu C, Weng H, Hellerbrand C, ten Dijke P, et al. Animal models of chronic liver diseases. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology*. 2013;304(5):G449-68.
108. Mederacke I. Liver fibrosis - mouse models and relevance in human liver diseases. *Zeitschrift fur Gastroenterologie*. 2013;51(1):55-62.
109. Castaneda B, Morales J, Lionetti R, Moitinho E, Andreu V, Perez-Del-Pulgar S, et al. Effects of blood volume restitution following a portal hypertensive-related bleeding in anesthetized cirrhotic rats. *Hepatology*. 2001;33(4):821-5.
110. Cho JJ, Hocher B, Herbst H, Jia JD, Ruehl M, Hahn EG, et al. An oral endothelin-A receptor antagonist blocks collagen synthesis and deposition in advanced rat liver fibrosis. *Gastroenterology*. 2000;118(6):1169-78.
111. Aller MA, Lorente L, Alonso S, Arias J. A model of cholestasis in the rat, using a microsurgical technique. *Scandinavian journal of gastroenterology*. 1993;28(1):10-4.
112. Georgiev P, Jochum W, Heinrich S, Jang JH, Nocito A, Dahm F, et al. Characterization of time-related changes after experimental bile duct ligation. *The British journal of surgery*. 2008;95(5):646-56.
113. Kesteloot F, Desmouliere A, Leclercq I, Thiry M, Arrese JE, Prockop DJ, et al. ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif 2 inactivation reduces the extent and stability of carbon tetrachloride-induced hepatic fibrosis in mice. *Hepatology*. 2007;46(5):1620-31.

114. Lee SS, Girod C, Braillon A, Hadengue A, Lebrec D. Hemodynamic characterization of chronic bile duct-ligated rats: effect of pentobarbital sodium. *The American journal of physiology*. 1986;251(2 Pt 1):G176-80.
115. Sikuler E, Buchs AE, Yaari A, Keynan A. Hemodynamic characterization of conscious and ketamine-anesthetized bile duct-ligated rats. *The American journal of physiology*. 1991;260(1 Pt 1):G161-6.
116. Popov Y, Sverdlov DY, Bhaskar KR, Sharma AK, Millonig G, Patsenker E, et al. Macrophage-mediated phagocytosis of apoptotic cholangiocytes contributes to reversal of experimental biliary fibrosis. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology*. 2010;298(3):G323-34.
117. Issa R, Williams E, Trim N, Kendall T, Arthur MJ, Reichen J, et al. Apoptosis of hepatic stellate cells: involvement in resolution of biliary fibrosis and regulation by soluble growth factors. *Gut*. 2001;48(4):548-57.
118. Abdel-Aziz G, Lebeau G, Rescan PY, Clement B, Rissel M, Deugnier Y, et al. Reversibility of hepatic fibrosis in experimentally induced cholestasis in rat. *The American journal of pathology*. 1990;137(6):1333-42.
119. NTP 12th Report on Carcinogens. Report on carcinogens : carcinogen profiles / US Dept of Health and Human Services, Public Health Service, National Toxicology Program. 2011;12:iii-499.
120. Weber LW, Boll M, Stampfl A. Hepatotoxicity and mechanism of action of haloalkanes: carbon tetrachloride as a toxicological model. *Critical reviews in toxicology*. 2003;33(2):105-36.
121. Tsukamoto H, Matsuoka M, French SW. Experimental models of hepatic fibrosis: a review. *Seminars in liver disease*. 1990;10(1):56-65.
122. Manibusan MK, Odin M, Eastmond DA. Postulated carbon tetrachloride mode of action: a review. *Journal of environmental science and health Part C, Environmental carcinogenesis & ecotoxicology reviews*. 2007;25(3):185-209.
123. Vorobioff J, Bredfeldt JE, Groszmann RJ. Increased blood flow through the portal system in cirrhotic rats. *Gastroenterology*. 1984;87(5):1120-6.
124. Proctor E, Chatamra K. High yield micronodular cirrhosis in the rat. *Gastroenterology*. 1982;83(6):1183-90.

125. Rosa H, Parise ER, Paranhos FR, Braga AL, Freitas AS, Hidalgo AN, et al. Controlled production of cirrhosis in the rat liver. *Arquivos de gastroenterologia*. 1991;28(1):39-43.
126. Mellencamp MA, Preheim LC. Pneumococcal pneumonia in a rat model of cirrhosis: effects of cirrhosis on pulmonary defense mechanisms against *Streptococcus pneumoniae*. *The Journal of infectious diseases*. 1991;163(1):102-8.
127. Dupin S, Delrat P, Le Quellec A, Voigt JJ, Houin G. Indocyanine green pharmacokinetics in rats with progressive carbon tetrachloride-induced hepatocellular insufficiency. *Arzneimittel-Forschung*. 1994;44(3):367-70.
128. Desmyter L, Fan YD, Praet M, Jaworski T, Vervecken W, De Hemptinne B, et al. Rating of CCl(4)-induced rat liver fibrosis by blood serum glycomics. *Journal of gastroenterology and hepatology*. 2007;22(7):1148-54.
129. Regimbeau J-M. Restrictive model of compensated carbon tetrachloride-induced cirrhosis in rats. *World Journal of Gastroenterology*. 2008;14(45):6943.
130. Distrutti E, Mencarelli A, Santucci L, Renga B, Orlandi S, Donini A, et al. The methionine connection: homocysteine and hydrogen sulfide exert opposite effects on hepatic microcirculation in rats. *Hepatology*. 2008;47(2):659-67.
131. Jiménez-Anguiano A. Modification of sleep architecture in an animal model of experimental cirrhosis. *World Journal of Gastroenterology*. 2009;15(41):5176.
132. Zipprich A, Loureiro-Silva MR, Jain D, D'Silva I, Groszmann RJ. Nitric oxide and vascular remodeling modulate hepatic arterial vascular resistance in the isolated perfused cirrhotic rat liver. *Journal of hepatology*. 2008;49(5):739-45.
133. Delgado MG, Gracia-Sancho J, Marrone G, Rodriguez-Vilarrupla A, Deulofeu R, Abraldes JG, et al. Leptin receptor blockade reduces intrahepatic vascular resistance and portal pressure in an experimental model of rat liver cirrhosis. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology*. 2013;305(7):G496-502.
134. Jang JH, Kang KJ, Kim YH, Kang YN, Lee IS. Reevaluation of experimental model of hepatic fibrosis induced by hepatotoxic drugs: an easy, applicable, and reproducible model. *Transplantation proceedings*. 2008;40(8):2700-3.
135. Geerts AM, Vanheule E, Praet M, Van Vlierberghe H, De Vos M, Colle I. Comparison of three research models of portal hypertension in mice: macroscopic,

histological and portal pressure evaluation. *International journal of experimental pathology*. 2008;89(4):251-63.

136. Di Vinicius I, Paula Baptista A, Barbosa AA, Andrade ZA. Morphological signs of cirrhosis regression. *Pathology - Research and Practice*. 2005;201(6):449-56.

137. Ackerly JA, Moore AF, Peach MJ. Demonstration of different contractile mechanisms for angiotensin II and des-Asp1-angiotensin II in rabbit aortic strips. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1977;74(12):5725-8.

138. Iredale JP, Benyon RC, Pickering J, McCullen M, Northrop M, Pawley S, et al. Mechanisms of spontaneous resolution of rat liver fibrosis. Hepatic stellate cell apoptosis and reduced hepatic expression of metalloproteinase inhibitors. *The Journal of clinical investigation*. 1998;102(3):538-49.

139. Fischer-Nielsen A, Poulsen HE, Hansen BA, Hage E, Keiding S. CCl4 cirrhosis in rats: irreversible histological changes and differentiated functional impairment. *Journal of hepatology*. 1991;12(1):110-7.

140. Perez-Tamayo R. Cirrhosis of the liver: a reversible disease? *Pathology annual*. 1979;14 Pt 2:183-213.

141. Fichas Internacionales de Seguridad Química. Tetracloruro de Carbono. 2000.

142. Perez Tamayo R. Is cirrhosis of the liver experimentally produced by CCl4 and adequate model of human cirrhosis? *Hepatology*. 1983;3(1):112-20.

143. Tsai PC, Fu TW, Chen YM, Ko TL, Chen TH, Shih YH, et al. The therapeutic potential of human umbilical mesenchymal stem cells from Wharton's jelly in the treatment of rat liver fibrosis. *Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society*. 2009;15(5):484-95.

144. Domenicali M, Caraceni P, Giannone F, Baldassarre M, Lucchetti G, Quarta C, et al. A novel model of CCl4-induced cirrhosis with ascites in the mouse. *Journal of hepatology*. 2009;51(6):991-9.

145. Chang ML, Yeh CT, Chang PY, Chen JC. Comparison of murine cirrhosis models induced by hepatotoxin administration and common bile duct ligation. *World journal of gastroenterology : WJG*. 2005;11(27):4167-72.

146. McLean EK, McLean AE, Sutton PM. Instant cirrhosis. An improved method for producing cirrhosis of the liver in rats by simultaneous administration of carbon tetrachloride and phenobarbitone. *British journal of experimental pathology*. 1969;50(5):502-6.
147. Liu F, Liu ZD, Wu N, Cong X, Fei R, Chen HS, et al. Transplanted endothelial progenitor cells ameliorate carbon tetrachloride-induced liver cirrhosis in rats. *Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society*. 2009;15(9):1092-100.
148. Runyon BA, Sugano S, Kanel G, Mellencamp MA. A rodent model of cirrhosis, ascites, and bacterial peritonitis. *Gastroenterology*. 1991;100(2):489-93.
149. Llovet JM, Bartoli R, Planas R, Cabre E, Jimenez M, Urban A, et al. Bacterial translocation in cirrhotic rats. Its role in the development of spontaneous bacterial peritonitis. *Gut*. 1994;35(11):1648-52.
150. Guarner C, Runyon BA, Heck M, Young S, Sheikh MY. Effect of long-term trimethoprim-sulfamethoxazole prophylaxis on ascites formation, bacterial translocation, spontaneous bacterial peritonitis, and survival in cirrhotic rats. *Digestive diseases and sciences*. 1999;44(10):1957-62.
151. Perez-Paramo M, Munoz J, Albillos A, Freile I, Portero F, Santos M, et al. Effect of propranolol on the factors promoting bacterial translocation in cirrhotic rats with ascites. *Hepatology*. 2000;31(1):43-8.
152. Bartoli R, Mane J, Cabre E, Lorenzo-Zuniga V, Planas R, Vinado B, et al. Effect of the administration of fermentable and non-fermentable dietary fibre on intestinal bacterial translocation in ascitic cirrhotic rats. *Clinical nutrition*. 2007;26(3):383-7.
153. Ubeda M, Munoz L, Borrero MJ, Diaz D, Frances R, Monserrat J, et al. Critical role of the liver in the induction of systemic inflammation in rats with preascitic cirrhosis. *Hepatology*. 2010;52(6):2086-95.
154. Varin F, Huet PM. Hepatic microcirculation in the perfused cirrhotic rat liver. *The Journal of clinical investigation*. 1985;76(5):1904-12.
155. Gold EJ, Francis RJB, Zimmermann A, Mellor SL, Cranfield M, Risbridger GP, et al. Changes in activin and activin receptor subunit expression in rat liver during the

development of CCl₄-induced cirrhosis. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2003;201(1-2):143-53.

156. Nakatsukasa H, Nagy P, Evarts RP, Hsia CC, Marsden E, Thorgeirsson SS. Cellular distribution of transforming growth factor-beta 1 and procollagen types I, III, and IV transcripts in carbon tetrachloride-induced rat liver fibrosis. *The Journal of clinical investigation*. 1990;85(6):1833-43.

157. Masuda H, Fukumoto M, Hirayoshi K, Nagata K. Coexpression of the collagen-binding stress protein HSP47 gene and the alpha 1(I) and alpha 1(III) collagen genes in carbon tetrachloride-induced rat liver fibrosis. *The Journal of clinical investigation*. 1994;94(6):2481-8.

158. Sogni P, Moreau R, Gomola A, Gadano A, Cailmail S, Calmus Y, et al. Beneficial hemodynamic effects of bosentan, a mixed ET(A) and ET(B) receptor antagonist, in portal hypertensive rats. *Hepatology*. 1998;28(3):655-9.

159. Wang YJ, Wang SS, Bickel M, Guenzler V, Gerl M, Bissell DM. Two novel antifibrotics, HOE 077 and Safironil, modulate stellate cell activation in rat liver injury: differential effects in males and females. *The American journal of pathology*. 1998;152(1):279-87.

160. Fang HL, Lai JJ, Lin WL, Lin WC. A fermented substance from *Aspergillus phoenicis* reduces liver fibrosis induced by carbon tetrachloride in rats. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*. 2007;71(5):1154-61.

161. Blanco-Rivero J, Marquez-Rodas I, Sastre E, Cogolludo A, Perez-Vizcaino F, del Campo L, et al. Cirrhosis decreases vasoconstrictor response to electrical field stimulation in rat mesenteric artery: role of calcitonin gene-related peptide. *Experimental physiology*. 2011;96(3):275-86.

162. Alvarez Gomez de Segura I, Benito de la Víbora J. Métodos de anestesia y analgesia. In: Martín Zuñiga J, Orellana Muriana JM, Tur Marí J, editors. *Ciencia y Tecnología del Animal de Laboratorio*. Madrid: Universidad de Alcalá y Sociedad Española para las Ciencias del Animal de Laboratorio (SECAL); 2011. p. 97-128.

163. Bazin JE, Constantin JM, Gindre G. [Laboratory animal anaesthesia: influence of anaesthetic protocols on experimental models]. *Annales francaises d'anesthesie et de reanimation*. 2004;23(8):811-8.

164. Richardson CA, Flecknell PA. Anaesthesia and post-operative analgesia following experimental surgery in laboratory rodents: are we making progress? Alternatives to laboratory animals : ATLA. 2005;33(2):119-27.
165. Lovell DP. Variation in pentobarbitone sleeping time in mice. 1. Strain and sex differences. Laboratory animals. 1986;20(2):85-90.
166. Belghiti J, Blanchet L, Lebrech D. Effects of general anaesthesia on portal venous pressure in the rat. European surgical research Europäische chirurgische Forschung Recherches chirurgicales europeennes. 1981;13(4):285-9.
167. Colombato LA, Sabba C, Polio J, Groszmann RJ. Influence of anesthesia, postanesthetic state, and restraint on superior mesenteric arterial flow in normal rats. The American journal of physiology. 1991;260(1 Pt 1):G1-6.
168. Fernandez M, Mejias M, Angermayr B, Garcia-Pagan JC, Rodes J, Bosch J. Inhibition of VEGF receptor-2 decreases the development of hyperdynamic splanchnic circulation and portal-systemic collateral vessels in portal hypertensive rats. Journal of hepatology. 2005;43(1):98-103.
169. Reboso Morales JA, Gonzalez Miranda F. [Ketamine]. Revista espanola de anestesiologia y reanimacion. 1999;46(3):111-22.
170. Kurdi MS, Theerth KA, Deva RS. Ketamine: Current applications in anesthesia, pain, and critical care. Anesthesia, essays and researches. 2014;8(3):283-90.
171. Green CJ, Knight J, Precious S, Simpkin S. Ketamine alone and combined with diazepam or xylazine in laboratory animals: a 10 year experience. Laboratory animals. 1981;15(2):163-70.
172. Calcaterra NE, Barrow JC. Classics in chemical neuroscience: diazepam (valium). ACS chemical neuroscience. 2014;5(4):253-60.
173. Nebendahl K. Chapter 24 - Routes of Administration. In: Krinke GJ, editor. The Laboratory Rat. London: Academic Press; 2000. p. 463-83.
174. Olkkola KT, Ahonen J. Midazolam and other benzodiazepines. Handbook of experimental pharmacology. 2008(182):335-60.
175. Stokes EL, Flecknell PA, Richardson CA. Reported analgesic and anaesthetic administration to rodents undergoing experimental surgical procedures. Laboratory animals. 2009;43(2):149-54.

176. Diven K. Inhalation anesthetics in rodents. *Lab animal*. 2003;32(3):44-7.
177. Miller ED, Jr., Kistner JR, Epstein RM. Whole-body distribution of radioactively labelled microspheres in the rat during anesthesia with halothane, enflurane, or ketamine. *Anesthesiology*. 1980;52(4):296-302.
178. Idvall J. Influence of ketamine anesthesia on cardiac output and tissue perfusion in rats subjected to hemorrhage. *Anesthesiology*. 1981;55(3):297-304.
179. Seyde WC, Longnecker DE. Anesthetic influences on regional hemodynamics in normal and hemorrhaged rats. *Anesthesiology*. 1984;61(6):686-98.
180. Conzen PF, Vollmar B, Habazettl H, Frink EJ, Peter K, Messmer K. Systemic and regional hemodynamics of isoflurane and sevoflurane in rats. *Anesthesia and analgesia*. 1992;74(1):79-88.
181. Araki M, Inaba H, Mizuguchi T. Differential effects of halothane, enflurane, isoflurane, and sevoflurane on the hemodynamics and metabolism in the perfused rat liver in fasted rats. *Journal of anesthesia*. 1995;9(1):52-7.
182. Grundmann U, Zissis A, Bauer C, Bauer M. In vivo effects of halothane, enflurane, and isoflurane on hepatic sinusoidal microcirculation. *Acta anaesthesiologica Scandinavica*. 1997;41(6):760-5.
183. Bahrami S, Benisch C, Zifko C, Jafarmadar M, Schochl H, Redl H. Xylazine-/diazepam-ketamine and isoflurane differentially affect hemodynamics and organ injury under hemorrhagic/traumatic shock and resuscitation in rats. *Shock*. 2011;35(6):573-8.
184. Wixson SK, White WJ, Hughes HC, Jr., Lang CM, Marshall WK. The effects of pentobarbital, fentanyl-droperidol, ketamine-xylazine and ketamine-diazepam on arterial blood pH, blood gases, mean arterial blood pressure and heart rate in adult male rats. *Laboratory animal science*. 1987;37(6):736-42.
185. Sumitra M, Manikandan P, Rao KV, Nayeem M, Manohar BM, Puvanakrishnan R. Cardiorespiratory effects of diazepam-ketamine, xylazine-ketamine and thiopentone anesthesia in male Wistar rats--a comparative analysis. *Life sciences*. 2004;75(15):1887-96.

186. Debaene B, Goldfarb G, Braillon A, Jolis P, Lebrec D. Effects of ketamine, halothane, enflurane, and isoflurane on systemic and splanchnic hemodynamics in normovolemic and hypovolemic cirrhotic rats. *Anesthesiology*. 1990;73(1):118-24.
187. Van Roey G, Lijnen P, Verbesselt R, Verbruggen A, Fevery J. Effect of narcotic agents and of bleeding on systemic and renal haemodynamics in healthy and CCl₄-treated cirrhotic rats. *Clinical science (London, England : 1979)*. 1997;93(6):549-56.
188. Lee SS, Girod C, Valla D, Geoffroy P, Lebrec D. Effects of pentobarbital sodium anesthesia on splanchnic hemodynamics of normal and portal-hypertensive rats. *The American journal of physiology*. 1985;249(4 Pt 1):G528-32.
189. National Research Council Institute for Laboratory Animal R. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Washington (DC): National Academies Press (US)
- Copyright 1996 by the National Academy of Sciences. All rights reserved.; 1996.
190. Loureiro-Silva MR, Iwakiri Y, Abralles JG, Haq O, Groszmann RJ. Increased phosphodiesterase-5 expression is involved in the decreased vasodilator response to nitric oxide in cirrhotic rat livers. *Journal of hepatology*. 2006;44(5):886-93.
191. Chojkier M, Groszmann RJ. Measurement of portal-systemic shunting in the rat by using gamma-labeled microspheres. *The American journal of physiology*. 1981;240(5):G371-5.
192. Bosoi CR, Parent-Robitaille C, Anderson K, Tremblay M, Rose CF. AST-120 (spherical carbon adsorbent) lowers ammonia levels and attenuates brain edema in bile duct-ligated rats. *Hepatology*. 2011;53(6):1995-2002.
193. Ishak K, Baptista A, Bianchi L, Callea F, De Groote J, Gudat F, et al. Histological grading and staging of chronic hepatitis. *Journal of hepatology*. 1995;22(6):696-9.
194. Tsochatzis E, Bruno S, Isgro G, Hall A, Theocharidou E, Manousou P, et al. Collagen proportionate area is superior to other histological methods for subclassifying cirrhosis and determining prognosis. *Journal of hepatology*. 2014;60(5):948-54.
195. Wixson SK, White WJ, Hughes HC, Jr., Lang CM, Marshall WK. A comparison of pentobarbital, fentanyl-droperidol, ketamine-xylazine and ketamine-diazepam anesthesia in adult male rats. *Laboratory animal science*. 1987;37(6):726-30.

196. Kharasch ED. Biotransformation of sevoflurane. *Anesthesia and analgesia*. 1995;81(6 Suppl):S27-38.
197. Karwacki Z, Kowianski P, Witkowska M, Karwacka M, Morys J. The technique of inhalation anaesthesia in experimental investigation in the rat. *Folia morphologica*. 2006;65(4):414-8.
198. Wixson SK, White WJ, Hughes HC, Jr., Lang CM, Marshall WK. The effects of pentobarbital, fentanyl-droperidol, ketamine-xylazine and ketamine-diazepam on core and surface body temperature regulation in adult male rats. *Laboratory animal science*. 1987;37(6):743-9.
199. Wixson SK, White WJ, Hughes HC, Jr., Marshall WK, Lang CM. The effects of pentobarbital, fentanyl-droperidol, ketamine-xylazine and ketamine-diazepam on noxious stimulus perception in adult male rats. *Laboratory animal science*. 1987;37(6):731-5.
200. Svendsen O. Ethics and animal welfare related to in vivo pharmacology and toxicology in laboratory animals. *Basic & clinical pharmacology & toxicology*. 2005;97(4):197-9; author reply 200-1.
201. Gaines Das R, North D. Implications of experimental technique for analysis and interpretation of data from animal experiments: outliers and increased variability resulting from failure of intraperitoneal injection procedures. *Laboratory animals*. 2007;41(3):312-20.
202. Chung A, Fishman M, Dasenbrook EC, Loparo KA, Dick TE, Jacono FJ. Isoflurane and ketamine anesthesia have different effects on ventilatory pattern variability in rats. *Respiratory physiology & neurobiology*. 2013;185(3):659-64.
203. Baker HJ, Lindsey JR, Weisbroth SH. Appendix 1 - Selected Normative Data. In: Franklin MASHWL, editor. *The Laboratory Rat (Second Edition)*. Burlington: Academic Press; 2006. p. 883-4.
204. Shi J, Hao JH, Ren WH, Zhu JR. Effects of heparin on liver fibrosis in patients with chronic hepatitis B. *World journal of gastroenterology : WJG*. 2003;9(7):1611-4.
205. Berry K, Taylor J, Liou IW, Ioannou GN. Portal vein thrombosis is not associated with increased mortality among patients with cirrhosis. *Clinical gastroenterology and*

hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association. 2015;13(3):585-93.

206. Weitz JI. Low-molecular-weight heparins. The New England journal of medicine. 1997;337(10):688-98.

207. Senzolo M, Rodriguez-Castro KI, Rossetto V, Radu C, Gavasso S, Carraro P, et al. Increased anticoagulant response to low-molecular-weight heparin in plasma from patients with advanced cirrhosis. Journal of thrombosis and haemostasis : JTH. 2012;10(9):1823-9.

208. Potze W, Arshad F, Adelmeijer J, Blokzijl H, van den Berg AP, Porte RJ, et al. Routine coagulation assays underestimate levels of antithrombin-dependent drugs but not of direct anticoagulant drugs in plasma from patients with cirrhosis. British journal of haematology. 2013;163(5):666-73.

209. Martell M, Coll M, Ezkurdia N, Raurell I, Genesca J. Physiopathology of splanchnic vasodilation in portal hypertension. World journal of hepatology. 2010;2(6):208-20.

210. Bosch J, Abraldes JG, Fernandez M, Garcia-Pagan JC. Hepatic endothelial dysfunction and abnormal angiogenesis: new targets in the treatment of portal hypertension. Journal of hepatology. 2010;53(3):558-67.

211. Buck M, Garcia-Tsao G, Groszmann RJ, Stalling C, Grace ND, Burroughs AK, et al. Novel inflammatory biomarkers of portal pressure in compensated cirrhosis patients. Hepatology. 2014;59(3):1052-9.

